Ministerium für Land-, Forst- und Nahrungsgüterwirtschaft
der
Deutschen Demokratischen Republik
Abteilung Veterinärwesen

Klinisch-chemische UNTERSUCHUNGSMETHODEN für veterinär-medizinische Einrichtungen der Deutschen Demokratischen Republik

Band 1

Institut für angewandte Tierhygiene Eberswalde-Finow

INHALTSVERZEICHNIS (Stand Dezember 1978)

INHALTSVERZEICHNIS (Stand Dezember 1978)

1. Fortsetzung

INHALTSVERZEICHNIS (Stand Dezember 1978)

2. Fortsetzung

Anlagen:

Reinigung:

Biologische Substrate werden durch Reinigung (Entfettung, Entfernung anhaftender Schmutzteilchen, ...) in definierte Ausgangsmaterialien für Mineralstoffanalysen überführt.

Haare, Knochen

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Trichloräthylen		

PROBENAUFBEREITUNG	Reinigung	Haare	A 05.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1		2 - 5 g pigmentiertes Deckhaar in Filterpapier zu Röllchen zusammenwickeln.	1
2	Extraktionsapparatur	mit Trichloräthylen extrahieren, bis das Lösungsmittel farblos abläuft (ca. 2 Stunden).	2
3		Filterröllchen an der Luft trocknen (Abzug!); Haare in Erlmeyerkolben überführen.	
4		+ 100 ml dest. Wasser schütteln (2 Min.), Waschwasser abdekantieren und verwerfen. Arbeitsschritt 4 noch 2 x wiederholen.	3
5		Probe bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C im Trockenschrank trocknen. Weiterverarbeitung der Haare nach Arbeitsvorschrift A 05.2 bzw. A 05.3.	

Anmerkungen:

1	Gewinnung von pigm. Deckhaar siehe Arbeitsvorschrift A 01.1 .
2	Zum Extrahieren verwendet man Soxhlet-Apparaturen oder auch handelsübliche Mehrzweckextraktoren.
3	Das letzte Spülwasser kann für den ersten Waschvorgang der nächsten Probe benutzt werden.

PROBENAUFBEREITUNG	Reinigung	Knochen	A 05.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	Skalpell (Knochensäge)	Knochenprobe mit Skalpell Knorpel, Periost und Kompakta entfernen und verwerfen. Nur Spongiosa weiterverarbeiten.	1
2	Soxhlet-Apparatur	Spongiosa 4 Stunden bei 105 °C (Trockenschrank!) im Becherglas trocknen; Probe in Filterpapier einwickeln und in Soxhlet-Apparatur 8 Stunden mit Trichloräthylen extrahieren.	
3		Probe anschließend bei 120 °C (Trockenschrank!) bis zur Gewichtskonstanz trocknen; im Exsikkator abkühlen lassen. Weiterverarbeitung der fettfreien Knochen-Trockensubstanz (FFT) nach Arbeitsvorschrift A 05.2 bzw. A 05.3.	

Anmerkungen:

1	Gewinnung der Knochenprobe erfolgt nach Arbeitsvorschrift A 01.1 .

Methodenbearbeitung:

Haare: BIV Gera, 1977
Knochen: IaT Eberswalde-Finow, 1976

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

PROBENAUFBEREITUNG — A 05.2

Veraschung:

Biologisches Material wird bei Temperaturen oberhalb 550 °C verascht. Die Asche wird in Salzsäure gelöst. In der so erhaltenen Lösung können die Mineralstoffe (Mengen- und Spurenelemente) nach den jeweiligen Arbeitsvorschriften quantitativ bestimmt werden.
Diese Methode ist nicht geeignet zur Bestimmung der Elemente Pb, Cd, Hg, Fe und As. In diesen Fällen ist es richtiger, die Arbeitsvorschrift A 05.3 anzuwenden.

Haare, Organe, Futtermittel, Knochen

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Salzsäure	25 %	Zu 330 ml dest. Wasser sind vorsichtig 670 ml konz. Salzsäure p.a. zu geben.

PROBENAUFBEREITUNG	Veraschung	Haare	A 05.2

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	Quarz-tiegel	2,5 g	pigmentiertes Deckhaar	1
			Probe in kalten Muffelofen stellen. Anschließend auf 550 - 600 °C erhitzen. Veraschungsdauer: ca. 6 Stunden. Abkühlen lassen.	2
2			Asche	
		+ 5,0 ml	Salzsäure	3
			Die Salzsäure ist im Veraschungstiegel auf die Asche zu geben. 60 Min. stehen lassen.	4
3		+ 20,0 ml	bidest. Wasser	
			mischen.	

Anmerkungen:

1	Reinigung von pigmentiertem Deckhaar siehe Arbeitsvorschrift A 05.1.
2	Achtung! Starke Geruchsbelästigung. Muffelofen im Abzug aufstellen.
3	Die Asche muß frei von Kohlenstoffpartikeln sein. Evtl. erneut erhitzen. Ofentemperatur kontrollieren!
4	Die Asche muß von der Salzsäure vollständig benetzt werden.

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	Quarztiegel	1,0 g bzw. 4,0 g	Organprobe (Trockensubstanz) Organprobe (Frischsubstanz)	1
			Probe in kalten Muffelofen stellen. Anschließend auf 550 - 600 °C erhitzen. Veraschungsdauer: ca. 6 Stunden. Abkühlen lassen.	2
2		 + 2,0 ml	Asche Salzsäure	3
			Die Salzsäure ist im Veraschungstiegel auf die Asche zu geben. 60 Min. stehen lassen.	4
3		+ 8,0 ml	bidest. Wasser	
			mischen.	

Anmerkungen:

1	Organprobe bei 105 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz (ca. 6 Stunden) trocknen; anschließend mörsern.
2	Achtung! Starke Geruchsbelästigung. Muffelofen im Abzug aufstellen.
3	Die Asche muß frei von Kohlenstoffpartikeln sein. Evtl. erneut erhitzen. Ofentemperatur kontrollieren.
4	Die Asche muß von der Salzsäure vollständig benetzt werden.

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	Quarztiegel	2,5 g	Futtermittel	1, 2
			Proben bei 550 - 600 °C im Muffelofen veraschen. Veraschungszeit: ca. 6 Stunden. Abkühlen lassen.	3
2			Asche vorsichtig mit wenig bidest. Wasser anfeuchten.	4
3		+ 5,0 ml	Salzsäure	
			60 Min. stehen lassen.	
4			Lg. quantitativ in 50 ml-Meßkolben überführen; mit bidest. Wasser auffüllen.	

Anmerkungen:

1	Probenvorbereitung nach TGL 80-21875, Blatt 2.
2	Die Proben sind vor der Einwaage bei 105 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz zu trocknen (ca. 3 Stunden).
3	Achtung! Starke Geruchsbelästigung. Muffelofen im Abzug aufstellen.
4	Die Asche muß frei von Kohlenstoffpartikeln sein. Evtl. erneut erhitzen. Ofentemperatur kontrollieren.

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmer-kungen
1	Quarz-tiegel	Quarztiegel bei 700 - 800 °C bis zur Gewichtskonstanz aus-glühen (ca. 2 Stunden) Tiegel wägen (= A mg)	
2		+ 0,4 g (mind. 0,1 g) Knochen (FFT)	1
		bei 700 - 800 °C im Muffelofen veraschen. Veraschungsdauer: ca. 8 Stunden. Im Exsikkator abkühlen lassen.	2
3		Tiegel erneut wägen (= B mg)	
4		Asche vorsichtig mit wenig bidest. Wasser anfeuchten.	3
5		+ 5,0 ml Salzsäure	
		60 Min. stehen lassen.	
6		Lg. quantitativ in 100 ml-Meß-kolben überführen; mit bidest. Wasser auffüllen.	

Berechnung:

$$\frac{\text{Tiegelgewicht B} - \text{Tiegelgewicht A}}{\text{Knocheneinwaage}} = \text{x mg Asche/g FFT (Knochen)}$$

Anmerkungen:

1	Reinigung von Knochenproben (Herstellung der FFT) siehe Arbeitsvorschrift A 05.1.
2	Achtung! Starke Geruchsbelästigung. Muffelofen im Abzug aufstellen.
3	Die Asche muß frei von Kohlenstoffpartikeln sein. Evtl. erneut erhitzen. Ofentemperatur kontrollieren.

Methodenbearbeitung:

Haare:
Organe:
Futtermittel: } BIV Gera, 1977

Knochen: IaT Eberswalde-Finow, 1976

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

Säureaufschluß:

Biologische Substrate werden mit einem Säuregemisch aufgeschlossen. In den so erhaltenen Aufschlußlösungen können quantitative Mineralstoffbestimmungen nach den jeweiligen Arbeitsvorschriften durchgeführt werden.

Haare, Organe, Futtermittel

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Schwefelsäure p.a.	96 %	
2	Perchlorsäure p.a.	70 %	
3	Salpetersäure p.a.	65 %	
4	Salpetersäure p.a.	32 %	Gleiche Volumenteile bidest. Wasser und Salpetersäure (65 %) vorsichtig mischen.
5	Aufschlußgemisch		9 Vol.-Teile Salpetersäure (65 %), 3 Vol.-Teile Perchlorsäure und 1 Vol.-Teil Schwefelsäure mischen.
6	Trichloräthylen		

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
			P	L	
1	Erlmeyerkolben (100 ml)	1,0 g	pigmentiertes Deckhaar	-	1, 2, 3
2		+ 10,0 ml	Aufschlußgemisch		
			mischen.		
3			auf Heizplatte (ca. 200 °C) im Abzug erhitzen, bis farbloser Rückstand erhalten wird und weiße Perchlorsäuredämpfe aufsteigen. Abkühlen lassen.		4 !
4			Rückstand in wenig bidest. Wasser aufnehmen; Lg. quantitativ in 10 ml-Meßkolben (oder graduiertes RG) überführen und auffüllen.		

Anmerkungen:

1	Reinigung von pigmentiertem Deckhaar siehe Arbeitsvorschrift A 05.1.
2	Zu jeder Probenreihe ist ein Leeransatz, der nur Aufschlußgemisch enthält, mitzuführen.
3	Alle Gefäße vor Gebrauch mit Salpetersäure (32 %) und 2 x mit bidest. Wasser spülen.
4	Verfärbt sich das Aufschlußgemisch braun bis schwarz, so ist die Reaktion sofort zu unterbrechen. Nach Abkühlung 5 ml Salpetersäure (65 %) zugeben und erneut erhitzen. Die Anlage 01.1 (Einsatz von Perchlorsäure ...) ist streng einzuhalten!

PROBENAUFBEREITUNG	Säureaufschluß	Organe	A 05.3

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P		L	
1	Erlmeyerkolben (100 ml)	1,0 g bzw. 4,0 g	Organprobe (Trockensubstanz) Organprobe (Frischsubstanz)	-	1,2, 3
2		+ 10,0 ml	Aufschlußgemisch		
			mischen; über Nacht stehen lassen.		4
3			auf Heizplatte (ca. 200 °C) im Abzug erhitzen bis farbloser Rückstand erhalten wird und weiße Perchlorsäuredämpfe aufsteigen. Abkühlen lassen.		5 !
4			Rückstand in wenig bidest. Wasser aufnehmen; Lg. quantitativ in 10 ml-Meßkolben (oder graduiertes RG) überführen und auffüllen.		

Anmerkungen:

1	Organproben bei 105 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz (ca. 6 Stunden) trocknen und anschließend mörsern.
2	Zu jeder Probenreihe ist ein Leeransatz, der nur Aufschlußgemisch enthält, mitzuführen.
3	Alle Gefäße vor Gebrauch mit Salpetersäure (32 %) und 2 x mit bidest. Wasser spülen.
4	Bei sofortiger Weiterverarbeitung ist den Probenansätzen je 0,5 ml Trichloräthylen zuzufügen.
5	Verfärbt sich das Aufschlußgemisch braun bis schwarz, so ist die Reaktion sofort zu unterbrechen. Nach Abkühlung 5 ml Salpetersäure (65 %) zugeben und erneut erhitzen. Die Anlage 01.1 (Einsatz von Perchlorsäure ...) ist streng einzuhalten!

PROBENAUFBEREITUNG	Säureaufschluß	Futtermittel	A 05.3

Ausführung:

	Geräte	Ausführung P	Ausführung L	Anmerkungen
1	Erlmeyerkolben (100 ml)	1,0 g Futtermittel (Trockensubstanz) -	-	1,2 3,4
2		+ 10,0 ml Aufschlußgemisch		
		mischen; über Nacht stehen lassen.		5
3		auf Heizplatte (ca. 200 °C) im Abzug erhitzen bis farbloser Rückstand erhalten wird und weiße Perchlorsäuredämpfe aufsteigen. Abkühlen lassen.		6!
4		Rückstand in wenig bidest. Wasser aufnehmen; Lg. quantitativ in graduiertes RG überführen; auf 20 ml auffüllen.		

Anmerkungen:

1	Probenvorbereitung nach TGL 80-21875, Blatt 2
2	Proben sind vor der Einwaage im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz (ca. 3 Stunden) zu trocknen und anschließend zu mörsern.
3	Zu jeder Probenreihe ist ein Leeransatz, der nur Aufschlußgemisch enthält, mitzuführen.
4	Alle Gefäße vor Gebrauch mit Salpetersäure (32 %) und 2 x mit bidest. Wasser spülen.
5	Bei sofortiger Weiterverarbeitung ist den Probenansätzen je 0,5 ml Trichloräthylen zuzufügen.
6	Verfärbt sich das Aufschlußgemisch braun bis schwarz, so ist die Reaktion sofort zu unterbrechen. Nach Abkühlung 5 ml Salpetersäure (65 %) zugeben und erneut erhitzen. Die Anlage 01.1 (Einsatz von Perchlorsäure ...) ist streng einzuhalten!

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1976

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

Kasein-Fällung:

Zur Bestimmung klin.-chem. Parameter in Milch (Kolostrum) ist es evtl. notwendig, vorher das Kasein durch Zugabe von Säure auszufällen.
Das nach der vorliegenden Methode gwonnene Milchserum (Molke) ist geeignet zur Bestimmung der Gesamtproteine (Arbeitsvorschrift E 01.1) und der Protein-Fraktionen (Arbeitsvorschrift E 02.1).

Milch (Kolostrum)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Essigsäure	ca. 5 %	Zu ca. 90 ml dest. Wasser 5 ml Eisessig p.a. geben; zu 100 ml mit dest. Wasser auffüllen.

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	PH	1,0 ml Milch (Kolostrum) + 1,0 ml dest. Wasser mischen; abkühlen auf 1 °C. 1 Min. zentrifugieren. Kalte Proben sofort (kalt!) weiterverarbeiten. Fettschicht mit spitzem Glasstab an den Rand drücken.	1
2	PH	1,0 ml entrahmte Milch im Wasserbad auf 35 °C erwärmen.	2
3		+ 0,1 ml Essigsäure Essigsäure langsam und unter Schwenken zugeben. Weitere 10 Min. im Wasserbad belassen; 5 Min. schütteln, zentrifugieren.	3 4
4		Milchserum mit Tropfpipette abnehmen und nach Bedarf weiterverarbeiten.	5

Anmerkungen:

1	Arbeitsschritt "Entrahmung" muß evtl. wiederholt werden.
2	Bei Entnahme der entrahmten Milch Pipettenspitze tief eintauchen und nach dem Ansaugen außen abwischen.
3	Flockt das Kasein nach Zugabe der Essigsäure nicht aus (bzw. ist das Milchserum nach der Zentrifugation trüb), so sind weitere 0,1 ml Essigsäure zuzugeben und Arbeitsschritt 3 ist zu wiederholen.
4	Der pH-Wert der Reaktionsmischung soll zwischen 4,5 und 4,8 liegen.
5	Es ist zu berücksichtigen, daß bei quant. Bestimmungen von Parametern in diesem Milchserum die Ergebnisse mit dem Faktor F = 2,2 (bei Zusatz von insgesamt 0,2 ml Essigsäure mit F = 2,4) zu multiplizieren sind.

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1976

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

METHÄMOGLOBIN
(HÄMIGLOBIN)

B 03.1

Methämoglobin hat bei 632 nm ein Absorptionsmaximum, das nach Überführung in Hämiglobincyanid verschwindet. Die Extinktionsdifferenz des hämolysierten Blutes vor und nach Zugabe von Kaliumcyanid ist proportional der Hämiglobin-Konzentration. Der Berechnung wird die an einer zweiten Probe des gleichen Blutes nach Oxydation des gesamten Hämoglobins ermittelte Extinktionsdifferenz zugrunde gelegt.

Blut (heparinisiert)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Puffer-Lg. (pH: 6,8)		a. 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) oder 23,875 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ in dest. Wasser zu 1 000 ml Lg. lösen. b. 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat in dest. Wasser zu 1 000 ml Lg. lösen. c. 492 ml Lg. b mit Lg. a zu 1 000 ml auffüllen. pH-Wert mit Glaselektrode überprüfen.
2	Kaliumcyanid-Lg.	ca. 0,5 g/ 100 ml	0,1 g Kaliumcyanid in 20 ml dest. Wasser lösen.
3	Hexacyanoferrat (III)-Lg.	ca. 5 g/ 100 ml	1 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 20 ml dest. Wasser lösen. Haltbarkeit: ca. 3 Tage bei 2 - 5 °C.

METHÄMOGLOBIN (HÄMIGLOBIN)	Blut	B 03.1

<u>Ausführung:</u>

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	PH	2,000 ml dest. Wasser + 0,250 ml heparinisiertes Blut ——— mischen. 10 Min. stehen lassen.		1
2		+ 2,000 ml Puffer-Lg. ——— mischen; zentrifugieren.		2
3	1 cm-Küvette	1,500 ml Überstand + 0,025 ml Wasser. ——— mischen; Extinktion (E_1) bei 630 nm gegen Wasser messen. + 0,025 ml Kaliumcyanid-Lg. ——— mischen; nach 5 Min. Extinktion (E_2) bei 630 nm gegen Wasser messen.	0,500 ml Überstand + 1,000 ml Puffer-Lg. + 0,025 ml Hexacyanoferrat-(III)-Lg. ——— mischen; Extinktion (E_3) nach 3 Min. bei 630 nm gegen Wasser messen. + 0,025 ml Kaliumcyanid-Lg. ——— mischen; nach 5 Min. Extinktion (E_4) bei 630 nm gegen Wasser messen.	

<u>Berechnung:</u>

$$\frac{E_1 - E_2}{3\,(E_3 - E_4)} \cdot 100\ \% = x\ \%\ \text{Methämoglobin}$$

METHÄMOGLOBIN (HÄMIGLOBIN)	Blut	B 03.1

Anmerkungen:

1	Die Bestimmung sollte möglichst schnell nach der Blutentnahme durchgeführt werden. Bei kühler Aufbewahrung (2 - 5 °C) in verschlossenen Gefäßen (z.B. PA) kann die Bestimmung noch nach 24 Stunden vorgenommen werden.
2	Die Blutverdünnung muß umgehend weiterverarbeitet werden.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow; 1978
Präzision: in der Serie: (n = 20)	s % $\leqslant$ 10,0
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 30 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

GESAMT-EIWEISS	E 01.2.S

Siebtest:

Verdünnte Serumproben werden auf Zelluloseazetatfolien oder Filterpapier aufgetragen und mit Amidoschwarz 10 B angefärbt.

Die Farbintensitäten der blauen Spots werden visuell gegen die von Test-Eiweiß-Lösungen eingeschätzt.

Serum

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Zelluloseazetat-Folie (Filterpapier FN 2)	
2	Amidoschwarz 10 B-Lg.	5 g Amidoschwarz 10 B in einer Mischung aus 900 ml Methanol und 100 ml Eisessig lösen. Farblösung vor Gebrauch filtrieren.
3	Entfärbebad	Mischung aus 900 ml Methanol und 100 ml Eisessig. Regenerierung des Entfärbebades durch Filtration über Aktivkohle.

GESAMT-EIWEISS	Siebtest	Serum	E 01.2.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	Mischplatte	0,200 ml dest. Wasser	1
2		P: + 0,010 ml Serum / St: + 0,010 ml Testserum mischen	2
3	Auftrageschablone	0,005 ml Verdünnung mit Auftrageschablone auf Zelluloseazetatfolie auftragen.	3
4		Folie sofort (ohne zu trocknen) in Färbebad legen (5 Min.). Danach im Entfärbebad entfärben bis die Folie außerhalb der Proben farblos ist (3 - 5 Min.). Dabei ist das Entfärbebad evtl. zweimal zu wechseln. Folie anschließend in Wasser legen.	
5		Blaue Spots visuell in <u>nassem</u> Zustand bewerten.	

Auswertung:

Die Farbintensitäten der blauen Spots sind proportional den Gesamt-Eiweiß-Konzentrationen in den Proben.

Die Farbintensität der blauen Spots der Proben ist gegen die des Testserum-Spots visuell abzuschätzen.

GESAMT-EIWEISS	Siebtest	Serum	E 01.2.S

Anmerkungen:

1	Die bereiteten Verdünnungen können auch für den GLUKOSE-Siebtest (K 01.2.S) und den γ-GLOBULIN-Siebtest (E 03.1.S) eingesetzt werden.
2	Als Testserum ist ein Serum der gleichen Tierart mit einer Eiweißkonzentration an den unteren Grenze des Normbereichs zu verwenden.
3	Anstelle der Zelluloseazetatfolie kann auch Filterpapier FN 2 eingesetzt werden. In diesem Fall ist das Filterpapier nach dem Auftragen der Serumproben mit der Heißluftdusche zu trocknen und anschließend zu färben. Die Entfärbung erfolgt nur 3 Min. mit dem angegebenen Entfärbebad und dann weiter mit 30%iger Essigsäure (1 - 2 Stunden). Das Filterpapier wird anschließend kurz in Methanol gespült und heiß getrocknet.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1976

Proben mit Eiweißkonzentrationsdifferenzen von ca. 0,5 g/100 ml sind deutlich voneinander zu unterscheiden.

Probenanzahl/Tag • AK: mind. 400 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

EIWEISS-Fraktionierung	E 02.1
Zelluloseazetat-Folien-Elektrophorese	
Serum (Anmerkung 1)	

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Natriumchlorid-Lg.	20 g Natriumchlorid in 100 ml dest. Wasser lösen.
2	Puffer-Lg.	8 g Barbital-Natrium und 4 g Natriumazetat p. a. in dest. Wasser lösen; auf 1 000 ml auffüllen.
3	Färbebad	5 g Amidoschwarz 10 B in einem Gemisch aus 900 ml Methanol und 100 ml Eisessig lösen. Lg. vor Gebrauch filtrieren.
4	Aktivkohle (gepulvert; Sorte EPN)	
5	Entfärbebad	Mischung aus 900 ml Methanol und 100 ml Eisessig bereiten. Regenerierung des Entfärbebades durch Filtration über Aktivkohle.
6	Transparenzbad	Mischung aus 74 ml 1,4-Dioxan und 26 ml i-Butanol bereiten.
7	Zelluloseazetat-Folie (Format: 20 x 75 mm)	

Ausführung:

A. Elektrophorese

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	Universal-Trennkammer mit Stromversorgungsgerät 301 E (CARL ZEISS Jena)	Trennkammer vorbereiten.	2
2		Zelluloseazetat-Folien waagerecht auf Puffer-Lg. fallen lassen (!) und danach untertauchen. Auf vollständiges Benetzen der Folien achten! Folie nach wenigen Min. auf Fließpapier legen und abtupfen.	2 3
3	Objektträger	Filterpapierstreifen (ca. 15x5 mm) auf Objektträger legen und mit Serum tränken. Serum mit einem Gummistempel ca. 20 mm vom unteren Ende der Folie als schmalen Strich (10 mm lang) senkrecht zur Laufrichtung auftragen.	
4		Folien in die vorbereitete Trennkammer einlegen. Gerät schließen; Spannung anlegen. Elektrophoresebedingungen: Spannung: 190 V Stromstärke: ca. 1 mA/Folie Laufzeit: 60 Min. (Puffer: pH: 8,6 - 9,0; Ionenstärke: 0,067) (Laufstrecke: 35 - 40 mm)	4
5		Apparatur abschalten und öffnen. Folien am unteren Rand mit Kugelschreiber beschriften und sofort weiter nach B. bearbeiten.	

EIWEISS-Fraktionierung	Zelluloseazetat-Folien-Elektrophorese	Serum	E 02.1

Ausführung:

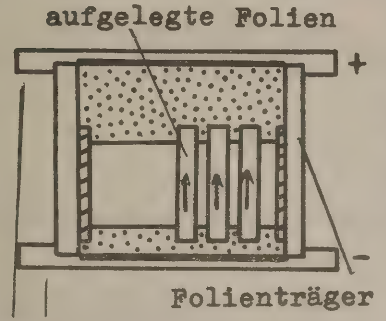
B. Anfärbung und Auswertung der Pherogramme

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1		Pherogramme sofort feucht 5 Min. in Färbebad legen. Färbebad leicht schwenken.	
2		Pherogramme bis zur völligen Entfärbung der eiweißfreien Bereiche in Entfärbebad legen (ca. 5 Min.). Entfärbebad während dieser Zeit zweimal erneuern.	
3	Objektträger	Pherogramme blasenfrei auf Objektträger aufziehen. Überschüssiges Entfärbebad mit Handballen (Gummihandschuhe tragen!) abstreichen. Pherogramme evtl. neu beschriften. Pherogramme bis zur Transparenz in Transparenzbad legen (max. 5 Min.!).	
4	Trockenschrank	Pherogramme sofort 5 Min. bei 100 - 105 °C im Trockenschrank härten.	
5	Auswertgerät ERI 65 m	Auswertung der Pherogramme entsprechend Gebrauchsanweisung des Auswertgerätes (Durchlichtmessung; Meßstrahlung: 560 nm; Abszissenstreckung).	5

Anmerkungen:

1 Serumproben für die elektrophoretische Eiweißfraktionierung dürfen nicht eingefroren werden!

2 Vorbereitung der Trennkammer:
Elektrodengefäße mit Natriumchlorid-Lg. füllen, Elektroden einführen[x]).
Kleine und große Pufferbecken mit Puffer-Lg. füllen. Puffer-Lg. in den kleinen Becken täglich, Puffer-Lg. in den großen Becken wöchentlich oder bei unbefriedigenden Trennergebnissen erneuern.
Folienträger auflegen und mit puffergetränkten Filterpapierstreifen entsprechend Abb. belegen.



Das Filterpapier muß in die Puffer-Lg. in beiden großen Becken eintauchen.
x) Neue Elektroden müssen vor der ersten Benutzung formiert werden: Elektrodengefäße mit Natriumchlorid-Lg. füllen; Elektroden einführen und anschließen. Große und kleine Pufferbecken mit Puffer-Lg. füllen. Folienträger auflegen und mit drei bis vier 4 cm breiten puffergetränkten Filterpapierstreifen, die in die Pufferlösungen eintauchen müssen, belegen. Apparatur schließen und mit einer Gleichspannungsquelle (ca. 200 V, 4 h) verbinden. Danach Apparatur öffnen, Flüssigkeitsstand in den Pufferbecken und den Elektrodengefäßen kontrollieren, umpolen und erneut eine gleichgroße Gleichspannung 2 h anlegen. Apparatur anschließend reinigen und w. o. für Elektrophoresen neu vorbereiten.

3 Die folgenden Arbeitsschritte müssen mit jeder Folie relativ schnell durchgeführt werden:
Folie aus Puffer-Lg. entnehmen - Folie auf Fließpapier legen und abtupfen - Serum auftragen (Folie verbleibt dabei auf dem feuchten Fließpapier!) - Folie in die Trennkammer einlegen - Folienträger mit Deckel abdecken. Es ist darauf zu achten, daß die Folien dabei nicht trocken werden (Entstehung heller Flecken!).

4 Die Folien werden zwischen die Filterpapierstreifen parallel zur Stromrichtung (s. Abb.) so gelegt, daß die Serumauftragstellen zur Kathode zeigen (die Proteine wandern unter den angegebenen Bedingungen zur Anode!).
Nach jeder Elektrophorese ist das Gerät umzupolen!

5 Bei stark gefärbten Pherogrammen kann der Extinktionsschreiber den oberen Anschlagspunkt erreichen. Dabei wird die richtige Aufzeichnung der Extinktionskurve unterbrochen und die Auswertergebnisse werden fehlerhaft. In solchen Fällen ist das Filter 530 nm in den Meßstrahlengang einzusetzen. Erscheint die Albuminbande sehr breit und dabei tiefschwarz, dann ist die Elektrophorese mit einer geringeren Serummenge zu wiederholen.



Berechnung:

1. Die quantitative Ermittlung der Anteile der einzelnen Eiweißfraktionen (rel. %) erfolgt durch Auswertung der vom Auswertgerät gezeichneten Extinktions- und Integrationskurve (s. dazu Gebrauchsanweisung).

2. Berechnung der absoluten Konzentrationen der einzelnen Eiweißfraktionen im Serum:

$$\frac{a \circ z}{100} = x \text{ g Eiweißfraktion A/100 ml Serum}$$

a: Fraktion A in rel. %
z: Gesamt-Eiweiß-Konzentration des Serums in g/100 ml (zu bestimmen nach Methode E 01.1).

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1973 - 1974

Präzision:

in der Serie: (n = 20)	Albumine:	s %	$\leq$ 3,0
	Globuline:	: s % : s % : s %	$\leq$ 6,0
von Tag zu Tag: (n = 10)	Albumine:	s %	$\leq$ 4,0
	Globuline:	: s % : s % : s %	$\leq$ 6,0

Probenanzahl/Tag • AK: abhängig von der Anzahl der eingesetzten Elektrophoreseapparaturen (ca. 50 Bestimmungen/App. • Tag)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979



γ-GLOBULINE	E 03.1

ZINKSULFAT-Trübungstest:

Durch Zink-Ionen werden im pH-Bereich von 6 - 8 vorrangig γ-Globuline aus Serum ausgefällt. Die Intensität der entstehenden Trübung korreliert positiv mit der γ-Globulinkonzentration. Die Methode ist nicht geeignet zur quantitativen γ-Globulin-Bestimmung. Als Ergebnis werden lediglich Trübungseinheiten angegeben.

Serum

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Bariumchlorid-Lg.	1,0 g/ 100 ml	1,17 g Bariumchlorid ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) in dest. Wasser zu 100 ml Lg. lösen.
2	Schwefelsäure	ca. 0,2 N	5,6 ml konz. Schwefelsäure mit dest. Wasser auf 1 000 ml auffüllen.
3	Puffer-Lg. (pH: 6,8)		140 mg Na-Azetat und 200 mg Barbital-Na in 1 000 ml dest. Wasser lösen, 5 ml 0,1 N Salzsäure zugeben. pH-Wert der Lg. mit weiterer Salzsäure auf 6,8 einstellen (Glaselektrode!).
4	Zinksulfat-Lg.	1,2 g/ 100 ml	1,2 g Zinksulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) in dest. Wasser zu 100 ml Lg. lösen.
5	Zinksulfat-Puffer-Lg. a		100 ml Puffer-Lg. mit 1,0 ml Zinksulfat-Lg. versetzen. Mischung täglich frisch bereiten.
6	Zinksulfat-Puffer-Lg. b		100 ml Puffer-Lg. mit 0,3 ml Zinksulfat-Lg. versetzen. Mischung täglich frisch bereiten.

γ-GLOBULINE	ZINKSULFAT-Trübungstest	Serum	E 03.1

Ausführung A : (Anmerkung 1)

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	PH (H-RG)	1,80 ml $ZnSO_4$-Puffer-Lg. a	1,80 ml Puffer-Lg.	s. Anmerkung 2	2
2		+ 0,02 ml Serum mischen.			3
3		Nach 30 Min. innerhalb von 1 h nach kurzem Schütteln bei 660 nm P und L gegen Wasser photometrieren. Gleichzeitig sind die Extinktionen der Bariumsulfat-St.-Suspensionen (Anmerkung 2) I, II und III zu messen.			

Berechnung:

1. Die Extinktionen der Leeransätze sind von denen der Probeansätze zu subtrahieren.

2. Durch Auftragen der Extinktionen der Bariumsulfat-St.-Suspensionen I, II, III gegen die entsprechenden Trübungseinheiten (Anmerkung 2) ist eine Eichkurve zu konstruieren.

3. Die Trübungseinheiten der Serumproben sind an dieser Eichkurve abzulesen.

Ausführung B: (Anmerkung 1)

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	PH (H-RG)	1,80 ml $ZnSO_4$-Puffer-Lg. b	-	s. Anmerkung 2	2 4
2		+ 0,02 ml Serum mischen.			3
3		Nach 30' innerhalb von 1 Stunde nach kurzem Schütteln bei 660 nm P gegen Wasser photometrieren. Gleichzeitig sind die Extinktionen der Bariumsulfat-Stand.-Suspensionen I, II, III (Anmerkung 2) zu messen.			

Berechnung:

1. Durch Auftragen der Extinktionen der Bariumsulfat-Stand.-Suspensionen I, II u. III gegen die entspr. Trübungseinheiten (Anmerkung 2) ist eine Eichkurve zu konstruieren.

2. Die Trübungseinheiten der Serumproben sind an dieser Eichkurve abzulesen.

Anmerkungen:

1 Der Zinksulfat-Trübungstest in der Ausführung A ist besonders geeignet, niedrige γ-Globulinkonzentrationen zu erfassen. Er wird deshalb vorrangig eingesetzt zur Überprüfung der γ-Globulinversorgung der Jungtiere in der Säugeperiode.
Der $ZnSO_4$-Trübungstest in der Ausführung B eignet sich vorrangig zur Erfassung von erhöhten γ-Globulin-Konzentrationen bei Tieren außerhalb der Säugeperiode.

2 Zur Eichung des Trübungstests sind Bariumsulfat-Standard-Suspensionen zu bereiten:
Die angegebenen ml Bariumchlorid-Lg. sind mit 0,2 N Schwefelsäure jeweils zu 10 ml aufzufüllen.

	ml $BaCl_2$-Lg.	Trübungs-einheiten
I	0.1	10
II	0.2	20
III	0.3	30

Die Lösungen sind vor dem Zusammengeben auf 2 – 4 °C abzukühlen. Die Standard-Suspensionen sind unmittelbar vor dem Messen zu bereiten und vor dem Einfüllen in die Küvetten gründlich durchzumischen.
Zur Vereinfachung der Arbeit kann in der unter Ausführung A bzw. B beschriebenen Weise SERULAT EG als Standardlösung mitgeführt werden. Die Trübungseinheiten des SERULAT EG müssen vorher ermittelt werden. Veränderungen treten bei angebrochener Flasche innerhalb von 2 Wochen nicht auf. Die Berechnung der Trübungseinheiten der Proben erfolgt dann nach der Formel:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot a = x \text{ TE} \qquad a = \text{TE des SERULAT EG}$$

3 Die Serumproben sollten möglichst am Entnahmetag verarbeitet werden. Ältere oder gefrorene Proben ergeben im allgemeinen niedrigere Trübungswerte.

4 Bei stark getrübten oder lipämischen Seren ist für jede Probe ein gesonderter Leerwert zu bereiten (s. dazu Ausführung A!).

γ-GLOBULINE	ZINKSULFAT- Trübungstest	Serum	E 03.1

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow; 1976
Präzision: in der Serie: (n = 20)	s % $\leq$ 4,5
Probenanzahl/Tag • AK:	mind. 250 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

γ-GLOBULINE	E 03.1.S

ZINKSULFAT-Trübungs-Siebtest:

Durch Zinkionen werden bei pH 6 - 8 vorrangig γ-Globuline aus Serumproben ausgefällt.
Die Intensitäten der auftretenden Trübungen (bzw. Fällungen) werden visuell eingeschätzt und mit einem Testserum verglichen.
Der Siebtest ist einzusetzen zur Einschätzung der γ-Globulinversorgung im postnatalen Zeitraum.

Serum

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Zinksulfat-Puffer-Lg. (pH 6,8)	a) 140 mg Natriumazetat und 200 mg Barbital-Natrium in 1 000 ml dest. Wasser lösen. 5 ml 0,1 N Salzsäure zugeben. pH-Wert der Lg. mit weiterer Salzsäure auf 6,8 einstellen (Glaselektrode!). b) 1,2 g Zinksulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) in dest. Wasser zu 100 ml Lg. lösen. c) 100 ml Puffer-Lg. a mit 2,0 ml Zinksulfat-Lg. b mischen. Lg. c täglich frisch bereiten.

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
1	Mischplatte		0,200 ml dest. Wasser		1
2			P	St	2, 3
		+	0,010 ml Serum	+ 0,010 ml Testserum	
			mischen.		
3	Tüpfelplatte		0,050 ml Verdünnung		
		+	0,110 ml Zinksulfat-Puffer-Lg.		
			mischen.		
4			Nach 10 Min. Trübungsintensitäten visuell einschätzen.		4

Auswertung:

Die Intensität der Trübungen korreliert positiv mit der γ-Globulinkonzentration der Serumproben.

Die Trübungsintensitäten der Serumproben werden visuell gegen die des Testserums eingeschätzt.

Anmerkungen:

1	Die bereiteten Serumverdünnungen können auch für den GLUKOSE-Siebtest (K 01.2.S) und den GESAMT-EIWEISS-Siebtest (E 01.2.S) eingesetzt werden.
2	Als Testseren sind Seren mit Trübungseinheiten an der unteren Normgrenze geeignet.
3	Stark lipämische Seren sind für diesen Siebtest nicht geeignet.
4	Nach längeren Standzeiten treten gewöhnlich Eiweißausflockungen auf, die schlechter zu beurteilen sind.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1976

Proben mit Trübungsdifferenzen von 2 - 3 Einheiten sind (vor allem im unteren Normbereich) deutlich voneinander zu unterscheiden.

Die Eichung von Testseren ist nach der Vorschrift E 03.1 vorzunehmen.

Probenanzahl/Tag • AK: mind. 500 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979



ASPARTATAMINOTRANSFERASE (GOT)
(2-Oxoglutarat-Aminotransferase; EC 2.6.1.1)

E 10.1

FERMOGNOST ® -GOT-UV-Test:
L-Aspartat reagiert mit 2-Oxoglutarat unter katalytischer Wirkung der GOT zu Oxalazetat und L-Glutamat. Oxalazetat wird danach durch $NADH_2$ in Gegenwart von Malatdehydrogenase (MDH) zu Malat reduziert.
Die Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme im UV-Bereich durch Umsetzung von $NADH_2$ zu NAD dient als Maß für die Enzymaktivität (kinetische Messung).

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	L-Aspartat-/Tris-Puffer-Lg.	Inhalt der Flasche 510 A in 30 ml dest. Wasser lösen, die in der Arbeitsanleitung des Herstellers vermerkte Menge Salzsäure zugeben und mit dest. Wasser zu 50 ml auffüllen. Haltbark.: max. 28 Tage bei 2 - 5 °C.
2	$NADH_2$-Lg.	Inhalt der Flasche 510 B in 5,0 ml Natriumhydrogenkarbonat-Lg. (1 %ig) lösen. Haltbark.: max. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
3	MDH-Lg.	1 Vol.-Teil des Inhalts der Flasche 510 C mit 4 Vol.-Teilen dest. Wasser mischen. Haltbark.: max. 12 Stden. bei 2 - 5 °C.
4	2-Oxoglutarat-Lg.	Inhalt der Flasche 510 D in 5,0 ml dest. Wasser lösen. Haltbark.: max. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
5	Substrat-Puffer-Gemisch	10 Vol.-Teile L-Aspartat-/Tris-Puffer-Lg., 1 Vol.-Teil $NADH_2$-Lg. und 1 Vol.-Teil MDH-Lg. mischen. Haltbark.: max. 8 Stden. bei 2 - 5 °C.

Konzentrationen im Testansatz:

	Ausführung A		Ausführung B	
L-Aspartat	214	mM	200	mM
Tris-Puffer	107	mM	100	mM
$NADH_2$	0,143	mM	0,133	mM
MDH	750	U/l	700	U/l
2-Oxoglutarat	13	mM	12	mM

Ausführung A (bei Verwendung von SPEKOL mit Meßansatz EK1 bzw. EK5):

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	H-RG	0,900 ml Substrat-Puffer-Gemisch	
2		P: + 0,075 ml Plasma (Serum); L: -; St: - mischen; 20 Min. bei 37 °C inkubieren (Wasserbad oder Heizblock).	
3		+ 0,075 ml 2-Oxoglutarat-Lg. kurz mischen (!).	
4		Extinktion von P gegen Wasser bei 366 nm sofort und danach noch 4mal im Abstand von je 120 Sek. bei 37 °C messen (Schichtdicke 1 cm).	2, 3 7

Berechnung:

a. Es sind die Differenzen ΔE aus zwei aufeinanderfolgenden Extinktionsmessungen zu berechnen.
Aus den 4 berechneten ΔE ist der Mittelwert $\overline{\Delta E}$ zu bilden

b. $\overline{\Delta E} \cdot 2121 = x$ U GOT/1000 ml Plasma (Serum)
(Anmerkung 6)

Ausführung B (bei Verwendung von SPEKOL mit Meßansatz EK5-aut und Schreiber (z.B. G1B1)):

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	H-RG	0,900 ml Substrat-Puffer-Gemisch	
2		P / L / St + 0,150 ml Plasma (Serum) / - / - mischen; 20 Min. bei 37 °C inkubieren (Wasserbad oder Heizblock).	
3		+ 0,075 ml 2-Oxoglutarat-Lg. kurz mischen (!!).	
4		Extinktion von P bei 366 nm sofort und danach noch 3mal im Abstand von je 1 Min. bei 37 °C messen (Schichtdicke 1 cm).	4 5 7

Berechnung:

a. Es sind die Differenzen ΔE aus zwei aufeinanderfolgenden Extinktionsmessungen zu berechnen.
Aus den 3 berechneten ΔE ist der Mittelwert $\overline{\Delta E}$ zu bilden

b. $\overline{\Delta E} \cdot 2273$ = x U GOT/1000 ml Plasma (Serum)
(Anmerkung 6)

Anmerkungen:

1	Als Antikoagulanz für die Plasmagewinnung nur Heparin verwenden. Max. Lagerzeit der Proben bis zur GOT-Bestimmung: Zimmertemp.: 2 Stunden; 2 - 5 °C: 24 Stunden; $<$-12 °C: 1 Monat (mind.)
2	Liegt die Extinktion der ersten Messung des Probeansatzes über 0,700, dann ist ein gesonderter Leeransatz aus 1,0 ml Wasser und 0,075 ml des betreffenden Plasmas (Serums) zu bereiten. Ein Leeransatz wird prinzipiell notwendig bei stark getrübten oder gefärbten Proben.
3	Ist $\overline{\Delta E}$ des Prüfansatzes höher als 0,050, dann ist die Plasma-(Serum-)Menge auf 0,050 bzw. 0,025 ml zu reduzieren. Das Ergebnis ist dann mit 1,46 bzw. 2,86 zu multiplizieren.
4	Küvettenwechselautomatik: 1 Min. Papiervorschub: 20 mm/Min. Filter zw. EK5-aut und Zellenhaus: UG2 Der Meßansatz EK5-aut wird mit 4 Probeansätzen beschickt. Ein Leeransatz ist nicht erforderlich.
5	Sind ΔE und damit auch $\overline{\Delta E}$ größer als 0,050, dann ist die Plasma-(Serum-)Menge auf 0,075 ml zu reduzieren. Das Ergebnis ist dann mit 1,87 zu multiplizieren.
6	Die Faktoren F = 2121 bzw. 2273 wurden errechnet aus der Beziehung: $F = \frac{V \cdot 1000}{E_K \cdot S}$ V = Volumen des Probeansatzes in ml E_K = Extinkt. Koeff. des $NADH_2$ bei 366 nm = 3,3 cm^2/ mol S = eingesetzte Plasma-(Serum-) Menge in ml
7	Küvetten immer in den thermostatierten Meßansätzen belassen. Vermessene Probenansätze mit Wasserstrahlpumpe absaugen!

ASPARTATAMINOTRANSFERASE (GOT)	FERMOGNOST ® - GOT-UV-Test	Plasma Serum	E 10.1

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: SVP Berlin, 1975; IaT Eberswalde, 1976

Präzision:

in der Serie: (n = 20) — s % $\leq$ 2,5

von Tag zu Tag: (n = 20) — s % $\leq$ 2,5 (bei $\bar{x}$ = 88 U/l)

Probenanzahl/Tag · AK:

nach Ausführung A : mind. 50 (Einzelbestimmungen)

nach Ausführung B : mind. 120 (Einzelbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

ASPARTATAMINOTRANSFERASE (GOT)
(2-Oxoglutarat-Aminotransferase; EC 2.6.1.1)

E 10.1.S

FERMOGNOST ® -GOT-Siebtest:

L-Aspartat reagiert mit 2-Oxoglutarat unter katalytischer Wirkung der GOT zu Oxalazetat und L-Glutamat. Das Oxalazetat wird in einer Indikatorreaktion mit $NADH_2$ zu Malat und NAD umgesetzt. Die Malatdehydrogenase (MDH) wirkt dabei als Katalysator. Beim Siebtest wird nach einer vorgegebenen Inkubationszeit die im Reaktionsgemisch noch vorhandene $NADH_2$-Menge nach UV-Anregung visuell gegen einen Standard eingeschätzt.

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	L-Aspartat-Tris-Puffer-Lg.	Inhalt der Flasche 510 A in 30 ml dest. Wasser lösen, die in der Arbeitsanweisung des Herstellers angegebene Menge Salzsäure zugeben und mit dest. Wasser zu 50 ml auffüllen. Haltbarkeit: max. 28 Tage bei 2 - 5 °C.
2	$NADH_2$-Lg.	Inhalt der Flasche 510 B in 5 ml Natriumhydrogenkarbonat-Lg. (1 g/100 ml) lösen. Haltbarkeit: max. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
3	MDH-Lg.	1 Vol.-Teil des Inhalts der Flasche 510 C mit 4 Vol.-Teilen dest. Wasser mischen. Haltbarkeit: max. 12 Stunden bei 2 - 5 °C.
4	2-Oxoglutarat-Lg.	Inhalt der Flasche 510 D in 5 ml dest. Wasser lösen. Haltbarkeit: max. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
5	Testlösung	1,0 ml L-Aspartat/Trispuffer-Lg., 0,6 ml $NADH_2$-Lg., 0,2 ml MDH-Lg. und 0,2 ml 2-Oxoglutarat-Lg. mischen. Haltbarkeit: max. 3 Stunden bei 2 - 5 °C.

Konzentrationen im Testansatz:

L-Aspartat:	120	mM;	MDH:	24 µg	
Tris-Puffer:	60	mM;	2-Oxoglutarat:	14,2	mM
$NADH_2$:	0,48	mM			

ASPARTATAMINOTRANSFERASE (GOT)	FERMOGNOST ®-GOT-UV-Siebtest	Plasma Serum	E 10.1.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	KAPA-Platte 1	3 µl Plasma (Serum)	3 µl Testplasma (-serum) (gleicher Tierart!)	2
2	KAPA-Platte 2	+ 12 µl Testlösung		
		Platte 2 auf Platte 1 legen. 30 Sek. mischen (Vibrationsmischer) 15 Min. bei Zimmertemperatur stehen lassen. Danach Plattenhälften trennen und Reaktionsmischung auf vorbereitetes Filterpapier FN 2 abklatschen; mit Heißluftdusche trocknen.		3
3		Filterpapier unter UV-Lampe betrachten.		

Auswertung:

Die Fluoreszenzintensität der Spots unter der UV-Lampe ist umgekehrt proportional der GOT-Aktivität in den Proben.

Die einzelnen Spots sind gegen den Testplasma-(-serum)Spot abzuschätzen.

Totale Fluoreszenzlöschung tritt unter diesen Bedingungen bei GOT-Aktivitäten $\geqslant$ 85 U/l ein.

Anmerkungen:

1	Maximale Lagerzeit der Plasma-(Serum-)Proben bis zur GOT-Bestimmung: Raumtemp.: 2 Stunden; 2 - 5 °C: 24 Stunden; ≤-12 °C: mind. 1 Monat.
2	Als Testplasma(-serum) ist ein Serum (Plasma) der gleichen Tierart mit einer GOT-Aktivität an der oberen Normgrenze zu verwenden.
3	Die angegebenen Reaktionsbedingungen sind geeignet für GOT-Aktivitäten ≤ 70 U/l. Bei höheren Normbereichen ist die Inkubationszeit zu verkürzen.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow; 1976

Proben mit GOT-Aktivitäts-Differenzen von 4 - 5 U/l sind (in der Umgebung des Normbereichs) deutlich voneinander zu unterscheiden.

Probenanzahl/Tag · AK: 400 - 500 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

LEUZINAMINOPEPTIDASE (LAP) (Leuzylpeptidhydrolase; EC 3.4.1.1)	E 11.1

FERMOGNOST®-LAP-Test:

Leuzinhydrazid wird durch die LAP hydrolysiert. Das dabei entstandene Hydrazin bildet mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurem Milieu einen orangeroten Farbstoff.

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Äthanolamin-Puffer-Lg.	Inhalt der Flaschen 517 A unverdünnt verwenden. Lg. bei 2 - 5 °C aufbewahren.
2	Leuzinhydrazid-Lg.	Inhalt der Flasche 517 B in 5,0 ml dest. Wasser lösen. Lg. sofort weiterverwenden.
3	Substrat-Puffer-Gemisch	1 Vol.-Teil Leuzinhydrazid-Lg. mit 4 Vol.-Teilen Äthanolamin-Puffer-Lg. mischen. Mischung sofort einsetzen. Bei $\leq$-12 °C ist die Mischung einige Tage haltbar.
4	4-Dimethylamino-benzaldehyd-Lg.	Inhalt der Flasche 517 C in 18 ml Äthanol (oder Methanol) lösen und mit 300 ml 0,1 N Salzsäure mischen. Haltbarkeit: mind. 3 Monate bei 2 - 5 °C.
5	Hydrazin-Standard-Lg.	1,4 ml Hydrazin-Lg. der Flasche 517 D mit dest. Wasser zu 50 ml auffüllen. Lg. kühl und dunkel aufbewahren.

Konzentrationen im Testansatz:

Äthanolamin-Puffer:	126	mM	(pH: 10,15)
Leuzinhydrazid:	17,6	mM	

LEUZINAMINOPEPTIDASE (LAP)	FERMOGNOST ® Farbtest	Plasma Serum	E 11.1

Ausführung 1 (für Serienbestimmungen):

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
		P / L / St	
1	H-RG	P: 0,020 ml Plasma (Serum); L: -; St: (s. Arbeitsschritte 1^x, 2^x, 3^x)	
		in Eiswasser stellen.	3
		P: + 0,250 ml; L: + 0,250 ml Substrat-Puffer-Gemisch (eisgekühlt)	2
		mischen. Genau 10 Min. bei 37 °C im Wasserbad inkubieren. Anschließend in Eiswasser stellen.	3, 4
2		+ 2,500 ml 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Lg. (+ 0,020 ml Plasma (Serum) nur beim Leeransatz!)	2
		mischen. 30 Min. bei 37 °C halten.	4
3		P und L gegen Wasser innerhalb von 6 Stunden bei 455 nm photometrieren.	5
		L^x / St	
1^x	H-RG	L^x: 0,020 ml Wasser; St: 0,020 ml Hydrazin-St.-Lg.	
2^x		+ 2,500 ml 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Lg.	
		mischen. 30 Min. bei 37 °C halten.	
3^x		St und L^x gegen Wasser innerhalb von 6 Stunden bei 455 nm photometrieren.	5

LEUZINAMINOPEPTIDASE (LAP)	FERMOGNOST® Farbtest	Plasma Serum	E 11.1

Ausführung 2 (für Einzelbestimmungen):

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	H-RG	0.250 ml Substrat-Puffer-Gemisch 5 Min. bei 37 °C im Wasserbad temperieren.	
2		P: + 0.020 ml Plasma (Serum) / L: - / St: (s. Arbeitsschritte 1^x, 2^x, 3^x) mischen. Genau 10 Min. im Wasserbad bei 37 °C inkubieren.	2
3		+ 2.500 ml 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Lg. (+ 0.020 ml Plasma (Serum) nur beim Leeransatz!) mischen. 30 Min. bei 37 °C halten.	2
4		P und L gegen Wasser innerhalb von 6 Stunden bei 455 nm photometrieren.	5
1^x	H-RG	L^x: 0.020 ml Wasser / St: 0.020 ml Hydrazin-St.-Lg.	
2^x		+ 2.500 ml 4-Dimethylaminobenzaldehyd-Lg. mischen. 30 Min. bei 37 °C halten.	
3^x		St und L^x gegen Wasser innerhalb von 6 Stunden bei 455 nm photometrieren.	5

Anmerkungen:

1	Plasma-(Serum-)gewinnung streng nach Arbeitsvorschrift A 02.1 bzw. A 03.1 durchführen. Als Antikoagulanz für die Plasmagewinnung nur Heparin verwenden. Lagerzeit der Proben bis zur LAP-Bestimmung: 2 - 5 °C: max. 24 Stunden; < -12 °C: mind. 1 Monat (Nach dem Auftauen sind die Proben sofort zu verarbeiten!).
2	Für jede Probe ist ein gesonderter Leeransatz zu bereiten!
3	Das Abkühlen der Probeansätze bewirkt ein starkes Absinken der Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Es wird dadurch möglich, größere Probenzahlen unter Routinebedingungen gleichzeitig unter gleichen Reaktionsbedingungen zu bearbeiten und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die bei dieser Arbeitsweise und unter Verwendung der angegebenen Geräte erhaltenen LAP-Aktivitäten liegen ca. 5 % niedriger als nach dem Original-FERMOGNOST-Test (Ausführung 2). Diese Abweichungen wurden in der Berechnungsvorschrift bereits berücksichtigt, so daß nach beiden Ausführungsformen gleiche Endergebnisse erhalten werden!
4	Für die Inkubation der Probenansätze bei 37 °C ist ein großvolumiges Wasserbad (Thermostat U 10; Inaktivierungswasserbad) zu verwenden.
5	Bei LAP-Bestimmungen in Schweineplasma(-serum) sind die Messungen in 0,5 cm-Küvetten durchzuführen, ansonsten nur, wenn die Extinktionen der Proben außerhalb des Meßbereiches des SPEKOL (Anmerkung 6) liegen. Wird auch dann noch der Meßbereich überschritten, dann sind der Plasma-(Serum-) und Hydrazin-St.-Einsatz in gleichem Maße weiter zu verringern. Ein Verdünnen der Proben ist nicht anzuraten.
6	Es empfiehlt sich, zur Überprüfung des SPEKOL und zur Festlegung des Meßbereichs eine Eichkurve aufzustellen: 1,4 ml Hydrazin-Lg. der Flasche 517 D mit dest. Wasser zu 10 ml Lg. auffüllen; Lg. schrittweise weiter verdünnen. Diese Lösungen werden, wie unter Ausführung 1ˣ - 3ˣ beschrieben, behandelt. Die Ergebnisse sind graphisch darzustellen. Der Meßbereich ist auf den geradlinigen Teil der Eichkurve zu beschränken.

Berechnung:

$$\frac{E_P - E_L}{E_{St} - E_L} \cdot F = x \text{ U LAP/1 000 ml Plasma (Serum)}$$

F (Ausführung 1) : 138
F (Ausführung 2) : 132

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: BIV Erfurt, 1976; IaT Eberswalde-Finow, 1977

Präzision:	in der Serie: (n = 10)	s% ⩽ 5,0
	von Tag zu Tag: (n = 20)	s% ⩽ 10,0 (bei $\bar{x}$ = 20 U/l)

Probenanzahl/Tag · AK: mind. 150 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

LEUZINAMINOPEPTIDASE (LAP)
(Leuzylpeptidhydrolase, EC 3.4.1.1)

E 11.1.S

FERMOGNOST® -LAP-Siebtest:

Leuzinhydrazid wird durch die LAP hydrolysiert. Das dabei entstandene Hydrazin bildet mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurem Milieu einen orangeroten Farbstoff. Beim LAP-Siebtest werden die farbigen Spots der Proben gegen einen Standard-Spot visuell eingeschätzt.

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Äthanolamin-Puffer-Lg.	Inhalt der Flaschen 517 A unverdünnt verwenden. Aufbewahrung bei 2 - 5 °C.
2	Leuzinhydrazid-Lg.	Inhalt der Flasche 517 B in 5,0 ml dest. Wasser lösen. Lg. frisch weiter verwenden.
3	Testlösung	1 Vol.-Teil Leuzinhydrazid-Lg. und 4 Vol.-Teile Äthanolamin-Puffer-Lg. mischen. Mischung umgehend einsetzen oder in Portionen von ca. 1 ml bei ≤-12 °C aufbewahren. Haltbarkeit: ca. 1 Woche.
4	Sprüh-Reagenz	Inhalt der Flasche 517 C in 10 ml Äthanol oder Methanol lösen. 1 Vol.-Teil dieser Lg. mit 5 Vol.-Teilen 0,5 N Salzsäure mischen. Lg. bei 2 - 5 °C aufbewahren.

Konzentrationen im Testansatz:

Äthanolamin-Puffer:	90,7 mM	(pH: 10,15)
Leuzinhydrazid:	12,7 mM	

LEUZINAMINOPEPTIDASE (LAP)	FERMOGNOST®-LAP-Siebtest	Plasma Serum	E 11.1.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	KAPA-Platte 1	0,005 ml Plasma (Serum)	0,005 ml Testplasma (-serum)	2
2	KAPA-Platte 2	+ 0,010 ml Testlösung		
		Platte 2 auf Platte 1 legen. 30 Sek. mischen (Vibrationsmischer). 10 Min. bei Raumtemperatur (≥ 20 °C) stehen lassen. Danach Plattenhälften trennen. Reaktionsmischung auf vorbereitetes Filterpapier FN 2 abklatschen. Mit Heißluftdusche trocknen		3
3		Filterpapier mit Sprühreagenz beidseitig gleichmäßig leicht besprühen.		
4		Nach ca. 5 Min. orangerote Spots visuell bewerten.		

Auswertung:

Die Farbintensitäten der orangeroten Spots sind proportional den LAP-Aktivitäten in den Proben.

Die Farbintensitäten der einzelnen Spots sind gegen die das Testplasma-(-serum-)Spots visuell abzuschätzen.

LEUZINAMINOPEPTIDASE (LAP)	FERMOGNOST® - LAP-Siebtest	Plasma Serum	E 11.1.S

Anmerkungen:

1	Als Antikoagulanz bei der Plasmaherstellung nur Heparin verwenden. Lagerzeit der Proben bis zur LAP-Bestimmung: 2 - 5 °C: max. 24 Stunden; 4 - 12 °C: mind. 1 Woche.
2	Als Testplasma (-serum) ist ein Plasma (Serum) mit einer LAP-Aktivität an der oberen Normgrenze zu verwenden.
3	Die angegebenen Reaktionsbedingungen sind geeignet für einen LAP-Normbereich von 60 - 200 U/l. Bei niedrigeren Normbereichen ist die Inkubationszeit auf 15 Min. zu verlängern.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1976

Proben mit LAP-Aktivitätsdifferenzen von ca. 10 U/l sind (in der Umgebung des Normbereiches) deutlich voneinander zu unterscheiden.

Probenanzahl/Tag • AK: mind. 500 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)
(Orthophosphatmonoester-phosphohydrolase;
EC 3.1.3.1)

E 12.1

FERMOGNOST®-Farbtest:

4-Nitrophenylphosphat wird unter katalytischer Einwirkung der AP hydrolysiert. Die Farbintensität des entstehenden gelben 4-Nitrophenol ist proportional der Aktivität der AP.

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Glykokoll-Puffer-Lg.	Inhalt der Flasche 518 A mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen. Haltbarkeit: mind. 30 Tage bei 2 - 5 °C.
2	4-Nitrophenylphosphat-Lg.	Inhalt jeder Flasche 518 B in 0,001 N Salzsäure zu 50 ml Lg. lösen. Haltbarkeit: lichtgeschützt mind. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
3	Nitrophenylphosphat-Puffer-Lg.	Gleiche Volumina Glykokoll-Puffer-Lg. und Nitrophenylphosphat-Lg. mischen. Haltbarkeit: max. 12 Stunden bei 2 - 5 °C.
4	Natronlauge (0,02 N)	2,0 ml N Natronlauge mit dest. Wasser zu 100 ml Lg. auffüllen.
5	4-Nitrophenol-Standard-Lg.	a) 10 ml Inhalt der Flasche 518 C mit dest. Wasser zu 25 ml auffüllen. Haltbarkeit: lichtgeschützt mind. 30 Tage bei 2 - 5 °C. b) 1,0 ml Lg. a) mit 1,0 ml Natronlauge mischen (≙ 100 U AP/l).

Konzentrationen im Testansatz:

Glykokoll-Puffer:	45,5 mM	(pH 10,4)
4-Nitrophenylphosphat:	4,15 mM	
Magnesiumchlorid:	0,43 mM	



Ausführung 1 (für Serienbestimmungen):

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	H-RG	0,02 ml Plasma (Serum)	0,02 ml dest. Wasser	0,02 ml Nitrophenol-Stand.-Lg. b)	2
			3 Min. in Eiswasser stellen.		3
2		+ 0,20 ml	Nitrophenylphosphat-Puffer-Lg. (eisgekühlt)		
			Genau 30 Min. bei 37 °C inkubieren, anschließend in Eiswasser stellen (5 Min.).		3, 4
3		+ 2,00 ml	Natronlauge		
			mischen.		
4			P und St gegen L innerhalb von 2 Stunden bei 405 nm photometrieren.		5

Ausführung 2 (für Einzelbestimmungen):

	Geräte	Ausführung				Anmerkungen
1	H-RG		0,20 ml Nitrophenylphosphat-Puffer-Lg. 5 Min. bei 37 °C im Wasserbad temperieren.			
2			P	L	St	2
		+	0,02 ml Plasma (Serum)	+ 0,02 ml dest. Wasser	+ 0,02 ml Nitrophenol-Stand.-Lg. b)	
			mischen. Genau 30 Min. bei 37 °C inkubieren.			
3		+	2,00 ml Natronlauge mischen.			
4			P und St gegen L innerhalb von 2 Stunden bei 405 nm photometrieren.			5



Anmerkungen:

1	Plasma-(Serum-)Gewinnung streng nach Arbeitsvorschrift A 02.1 bzw. A 03.1 durchführen. Als Antikoagulanz für die Plasmagewinnung nur Heparin verwenden. Lagerzeit der Plasma-(Serum-)Proben bis zur AP-Bestimmung: Zimmertemperatur: max. 6 Stunden; 2 - 5 °C: max. 48 Stunden; ≤ - 12 °C: mind. 2 Monate.
2	Bei ikterischen oder getrübten Proben ist ein gesonderter Leeransatz L^x für jede Probe zu bereiten: Anstelle von 0,02 ml Wasser (Arbeitsschritt 1) ist nach der Zugabe von Natronlauge (Arbeitsschritt 3) 0,02 ml Plasma (Serum) zuzufügen. Man photometriert dann zweckmäßig alle Ansätze gegen Wasser.
3	Das Abkühlen der Probeansätze bewirkt eine Verminderung der Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Es wird dadurch möglich, eine größere Probenanzahl unter Routinebedingungen gleichzeitig und unter gleichen Reaktionsbedingungen zu bearbeiten und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die bei dieser Arbeitsweise erhaltenen AP-Aktivitäten liegen um weniger als 2 % niedriger als nach dem Original-FERMOGNOST®-Test, wenn die angegebenen Geräte verwendet werden. Diese geringen Abweichungen wurden in der Berechnungsvorschrift nicht berücksichtigt.
4	Für die Inkubation der Probeansätze bei 37 °C ist ein großvolumiges Wasserbad (Thermostat U 10, Inaktivierungswasserbad WABA 160 oder 240) zu verwenden.
5	Liegt die Extinktion der Proben außerhalb des Meßbereiches des SPEKOL (Anmerkung 6), dann sind die Messungen in 0,5-cm-Küvetten zu wiederholen. Wird der Meßbereich auch dann noch überschritten, so ist die Bestimmung mit verringerter Inkubationszeit (10 bzw. 5 Min.) zu wiederholen. Das Berechnungsergebnis ist dann mit 3 bzw. 6 zu multiplizieren.
6	Zur Festlegung des Meßbereiches des SPEKOL ist eine Eichkurve aufzustellen. Dazu werden 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 7,5 ml 4-Nitrophenol-Stand.-Lg. a) mit Natronlauge auf 10 ml aufgefüllt (≙ 20, 40, 60, 100, 150 U AP/l). Diese Lösungen werden, wie unter "Ausführung" beschrieben, anstelle von Plasma (Serum) eingesetzt und gegen L photometriert. Die Extinktionen sind gegen U/l graphisch darzustellen. Der Meßbereich ist auf den geradlinigen Teil der Eichkurve zu beschränken.

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)	FERMOGNOST® - Farbtest	Plasma Serum	E 12.1

Berechnung:

Für Ausführung 1 und Ausführung 2:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot 100 = x \text{ U AP/1 000 ml Plasma (Serum)}$$

Bei ikterischen oder getrübten Proben:

$$\frac{(E_P - E_L x)}{(E_{St} - E_L)} \cdot 100 = x \text{ U AP/1 000 ml Plasma (Serum)}$$

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	SVP Berlin, 1975 IaT Eberswalde-Finow, 1976
Präzision:	
in der Serie (n = 20)	s % $<$ 3,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % $<$ 4,0 (bei $\bar{x}$ = 64 U/l)
Probenanzahl/Tag • AK:	mind. 150 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979



ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP) (Orthophosphatmonoester-phosphohydrolase; EC 3.1.3.1)	E 12.1.S

FERMOGNOST®-Farb-Siebtest:

4-Nitrophenylphosphat wird unter katalytischer Wirkung der AP hydrolysiert. Die Farbintensität des entstehenden gelben 4-Nitrophenols ist proportional der Aktivität der AP.

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Glykokoll-Puffer-Lg.	Inhalt der Flasche 518 A mit dest. Wasser zu 100 ml auffüllen. Haltbarkeit: mind. 30 Tage bei 2 - 5 °C.
2	Nitrophenylphosphat-Lg.	Inhalt jeder Flasche 518 B in 0,001 N Salzsäure zu 50 ml Lg. lösen. Haltbarkeit: mind. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
3	Testlösung	Gleiche Volumina Glykokoll-Puffer-Lg. und Nitrophenylphosphat-Lg. mischen. Haltbarkeit: max. 12 Stunden bei 2 - 5 °C.
4	Alkalisiertes Filterpapier	4 g Natriumhydroxyd p. a. in dest. Wasser zu 1 000 ml Lg. lösen Mit dieser Lg. Filterpapier FN 2 beidseitig besprühen und anschließend im Trockenschrank trocknen.

Konzentrationen im Testansatz:

Glykokoll-Puffer:	33,3 mM	(pH: 10,4)
Nitrophenylphosphat:	3,0 mM	
Magnesiumchlorid:	0,32 mM	



ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)	FERMOGNOST®-Farb-Siebtest	Plasma Serum	E 12.1.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		P	St	
1	KAPA-Platte 1	0,005 ml Plasma (Serum)	0,005 ml Test-plasma (-serum)	2
2	KAPA-Platte 2	+ 0,010 ml Testlösung Platte 2 auf Platte 1 legen. 30 Sek. mischen (Vibrationsmischer). 20 Min. bei Raumtemperatur (>20 °C) stehen lassen. Danach Plattenhälften trennen. Reaktionsmischung auf alkalisiertes Filterpapier FN 2 abklatschen und mit Heißluftdusche kurz antrocknen.		3
3		Gelbe Spots (noch feucht!) im Durchlicht visuell bewerten.		

Auswertung:

Die Farbintensität der gelben Spots ist proportional der AP-Aktivität in den Proben.

Die Farbintensitäten der einzelnen Spots sind gegen die des Testplasma-(-serum-)Spots visuell abzuschätzen.

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)	FERMOGNOST® - Farb-Siebtest	Plasma Serum	E 12.1.S

Anmerkungen:

1	Als Antikoagulanz bei der Plasmagewinnung nur Heparin verwenden. Lagerzeit der Proben bis zur AP-Bestimmung: Raumtemperatur: max. 6 Stunden; 2 - 5 °C: max. 48 Stunden; ≤ - 12 °C: mind. 2 Monate.
2	Als Testplasma (-serum) ist ein Plasma (Serum) mit einer AP-Aktivität an der oberen Grenze des Normbereiches geeignet.
3	Die angegebenen Reaktionsbedingungen gelten für AP-Aktivitäten bis 100 U/l. Bei höheren Aktivitäten ist die Inkubationszeit auf 10 Min. zu beschränken.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1976
Proben mit AP-Aktivitätsdifferenzen von 5 bis 8 U/l sind (in der Umgebung des Normbereiches) deutlich voneinander zu unterscheiden.	
Probenanzahl/Tag • AK:	mind. 500 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)
(Orthophosphatmonoester-phosphohydrolase;
EC 3.1.3.1)

E 12.2

Kinetischer Test (modifizierter FERMOGNOST® -AP-Test):
Die Hydrolyse von 4-Nitrophenylphosphat wird durch die AP katalysiert. Die Farbintensität des entstehenden gelben 4-Nitrophenols ist proportional der Aktivität der AP.
Beim kinetischen Test werden die Lösungen des FERMOGNOST® -AP-Farbtest verwendet. Er ist dem Original-FERMOGNOST® -AP-Farbtest vorzuziehen.
Achtung! Bei Bilirubin-Konzentrationen im Plasma bzw. Serum oberhalb des Normbereichs ist die Methode E 12.1 anzuwenden!

Plasma, Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	Glykokoll-Puffer-Lg.	Inhalt der Flasche 518 B mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen. Haltbarkeit: mind. 30 Tage bei 2 - 5 °C
2	4-Nitrophenylphosphat-Lg.	Inhalt jeder Flasche 518 B in 0,001 N Salzsäure zu 50 ml Lg. lösen. Haltbarkeit: lichtgeschützt mind. 7 Tage bei 2 - 5 °C.
3	Nitrophenylphosphat-Puffer-Lg.	Gleiche Volumina Glykokoll-Puffer-Lg. und Nitrophenylphosphat-Lg. mischen. Haltbarkeit: max. 12 Stunden bei 2 - 5 °C.

Konzentrationen im Testansatz:

Glykokoll-Puffer:	48,0 mM	(pH 10,4)
4-Nitrophenylphosphat:	4,37 mM	
Magnesiumchlorid:	0,46 mM	

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)	Kinetischer Test	Plasma Serum	E 12.2

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	H-RG	1,00 ml Nitrophenylphosphat-Puffer-Lg. 5 Min. im Wasserbad (37 °C) erwärmen.	
2		P: + 0,04 ml Plasma (Serum); L: -; St: - mischen. Mischung sofort in temperierte (37 °C) 1-cm-Küvetten überführen.	2, 3
		Extinktion von P gegen Wasser bei 405 nm sofort und danach noch dreimal im Abstand von 1 Min. bei 37 °C messen.	4

Berechnung:

a) Es sind die Differenzen Δ E aus zwei aufeinanderfolgenden Extinktionsmessungen zu berechnen.
Aus den drei berechneten Δ E ist der Mittelwert $\overline{\Delta E}$ zu bilden.

b) $\overline{\Delta E} \cdot F$ = x U AP/1 000 ml Plasma (Serum)

	Plasma-(Serum-)Einsatz		
	0,040 ml	0,020 ml	0,010 ml
F	1 398	2 742	5 430

(Anmerkung 4)

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)	Kinetischer Test	Plasma Serum	E 12.2

Anmerkungen:

1	Plasma-(Serum-)Gewinnung streng nach Arbeitsvorschrift A 02.1 bzw. A 03.1 durchführen. Als Antikoagulanz für die Plasmagewinnung nur Heparin verwenden. Lagerzeit der Proben bis zur AP-Bestimmung: Zimmertemperatur: max. 6 Stunden; 2 - 5 °C: max. 48 Stunden; $\leq$ - 12 °C: mind. 2 Monate.
2	Achtung! Mikroliterpipetten vor Verwendung eichen und täglich überprüfen!
3	Bei $\overline{\Delta E} > 0{,}15$ (s. Abschnitt "Berechnung") ist der Plasma-(Serum-)Einsatz auf 0,020 bzw. 0,010 ml zu reduzieren.
4	Der Meßansatz muß mit einem Umwälzthermostaten temperiert werden. Es empfiehlt sich die Verwendung des Meßansatzes EK 5-aut, der das Vermessen von 3 Proben (und 1 Leerwert) nebeneinander, bzw. des Meßansatzes EK 5-aut in Verbindung mit der Küvettenwechselautomatik und dem Schreiber G1B1, der das Vermessen von 4 Proben (Leerwert kann entfallen) nebeneinander gestattet. Meßeinstellung: SPEKOL mit Meßansatz EK 5-aut und Küvettenwechselautomatik Photozelle mit Graufilter 10 % Wechselautomatik: 1 Min. Papiervorschub (G1B1): 2 cm/Min.
5	Der Faktor F errechnet sich aus der Beziehung: $$F = \frac{V \cdot 100}{E_K \cdot S}$$ V = Volumen des Probenansatzes E_K = Molarer Extinktionskoeffizient des Nitrophenol bei 405 nm (18,6 $cm^2 \cdot Mol^{-1}$) S = eingesetzte Plasma-(Serum-)Menge in ml .

ALKALISCHE PHOSPHATASE (AP)	Kinetischer Test	Plasma Serum	E 12.2

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung: IaT Eberswalde-Finow, 1977

Präzision:

in der Serie: (n = 20) — s % $\leqslant$ 3,0

von Tag zu Tag: (n = 20) — s % $\leqslant$ 4,0 (bei $\bar{x}$ = 64 U/l)

Probenanzahl/Tag · AK: mind. 150 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

LEUCINARYLAMIDASE (EC 3.4.11.2.)	E 13.1

<u>Kinetischer Test:</u>
Die Leucinarylamidase katalysiert die Hydrolyse von Leucylarylamiden. Die Bestimmung basiert auf der Spaltung von Leucin-p-nitranilid. Das pro Zeiteinheit gebildete gelbe p-Nitranilin ist der Enzymaktivität proportional.

Serum, Plasma (Anmerkung 1)

<u>Reagenzien:</u>

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Phosphatpuffer (pH: 7,2)	0,05 M	a. 6,8 g KH_2PO_4 m. dest. H_2O zu 1 000 ml Lg. lösen. b. 8,9 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (oder 17,9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) mit dest. H_2O zu 1 000 ml Lg. lösen. c. 726 ml Lg. b u. 274 ml Lg. a mischen. pH-Wert mit Glaselektrode kontrollieren.
2	Leucin-p-nitranilid	0,025 M	63 mg Leucin-p-nitranilid in Methanol p.a. zu 10 ml Lg. lösen. <u>Haltbarkeit:</u> 6 Monate lichtgeschützt bei 2 - 5 °C.
3	Substrat-Puffer-Lg.		25 ml Puffer-Lg. und 1 ml Leucin-p-nitranilid-Lg. mischen. <u>Haltbarkeit:</u> 1 Tag.

<u>Konzentrationen im Testansatz:</u>

Phosphatpuffer:	43,7 mM
Leuzin-p-nitranilid:	0,87 mM

LEUCINARYLAMIDASE	Kinetischer Test	Serum, Plasma	E 13.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
1	H-RG	1,000 ml Substrat-Puffer-Lg. 5 Min. auf 37 °C temperieren.	
2		P / L / St + 0,100 ml Serum (Plasma) / - / - kurz mischen und in vortemperierte Küvette (Schichtdicke 1 cm) überführen.	
3		Extinktion von P gegen Wasser bei 405 nm sofort und danach noch 3mal im Abstand von 1 Min. (bei 37 °C!) messen.	2, 3

Berechnung:

a. Es sind die Differenzen Δ E aus zwei aufeinanderfolgenden Messungen zu berechnen. Aus den 3 berechneten Δ E ist der Mittelwert $\overline{\Delta E}$ zu bilden.

b. $\overline{\Delta E} \cdot 1\,110$ = x U Leucinarylamidase/l Serum (Plasma)
(Anmerkungen: 2, 4)

Anmerkungen:

1	Max. Lagerzeit der Proben bis zur Enzym-Aktivitäts-Bestimmung: Bei 2 - 5 °C: Mind. 24 h; $<$ -12 °C: 1 Monat (mind.) Als Antikoagulanz bei der Plasmagewinnung ist Heparin zu verwenden.
2	Sind ΔE und damit auch $\overline{\Delta E}$ größer als ca. 0,1, dann ist die Serum-(Plasma-)menge auf 0,050 bzw. 0,020 ml zu reduzieren (In diesen Fällen ist bei der Berechnung $\overline{\Delta E}$ mit den Faktoren F = 2 119 bzw. F = 5 146 zu multiplizieren.) oder die Proben sind mit physiologischer Kochsalzlösung (1 Teil Serum (Plasma) + 9 Teile phys. Kochsalzlg.) zu verdünnen (Berechnungsergebnis mit dem Faktor 10 multiplizieren!).
3	Bei größeren Serien empfiehlt sich die Verwendung des Meßansatzes EK 5-aut, der das Vermessen von 4 Proben nebeneinander gestattet. In jedem Fall muß der Meßansatz mit einem Umwälzthermostaten genau temperiert werden.
4	Der Faktor F = 1 110 (bzw. 2 119 bzw. 5 146) errechnet sich aus der Beziehung: $F = \frac{V \cdot 1\,000}{E_K \cdot S}$ V = Volumen des Probenansatzes in ml. E_K = Molarer Ext.-Koeff. des p-Nitranilins bei 405 nm = 9,91 cm^2/ Mol. S = eingesetzte Serum-(Plasma-)menge in ml.

LEUCINARYLAMIDASE	Kinetischer Test	Serum, Plasma	E 13.1

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow; 1978
Präzision:	
in der Serie: (n = 20)	s % ≤ 3,0
von Tag zu Tag: (n = 18)	s % ≤ 13,0 (bei $\bar{x}$ = 11 U/l)
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 70 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

γ-GLUTAMYL-TRANSPEPTIDASE (γ-GT) (EC 2.3.2.2.)	E 14.1

Kinetischer Test:

γ-Glutamyl-p-nitranilid reagiert mit Glycylglycin unter Bildung von γ-Glutamyl-glycylglyzid u. p-Nitranilin bei katalytischer Wirkung der γ-GT. Das pro Zeiteinheit entstehende p-Nitranilin ist der Enzymaktivität proportional.

Serum (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	Tris-Puffer (pH: 8,25)	200 mM	12,114 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan in 400 ml dest. Wasser lösen. pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf 8,25 einstellen (Glaselektrode!); zu 500 ml Lg. auffüllen.
2	Substrat-Puffer-Lg.		126,2 mg γ-Glutamyl-p-nitranilid in ca. 75 ml Tris-Puffer bei 50 - 60 °C lösen, 727,0 mg Glycylglycin zugeben; mit Tris-Puffer auf 100 ml auffüllen. Haltbarkeit: ca. 2 Monate bei -10 °C. Evtl. Ausflockungen sind durch Erwärmen der Lg. auf 56 °C zu lösen. (Anmerkung 2)

Konzentrationen im Testansatz:

Tris-Puffer:	182 mM
γ-Glutamyl-p-nitranilid:	4,3 mM
Glycylglycin:	50 mM

γ-GLUTAMYL-TRANSPEPTIDASE (γ-GT)	Kinetischer Test	Serum	E 14.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
1	H-RG	1,000 ml Substrat-Puffer-Lg.			
			5 Min. auf 37 °C temperieren.		
2		P	L	St	
		+ 0,100 ml Serum	-	-	
			kurz mischen und in vortemperierte Küvette (Schichtdicke 1 cm) überführen.		
3			Extinktion von P gegen Wasser bei 405 nm sofort und danach noch 3 x im Abstand von 1 Min. (bei 37 °C) messen.		

Berechnung:

a. Es sind die Differenzen ΔE aus zwei aufeinanderfolgenden Messungen zu berechnen. Aus den 3 berechneten ΔE ist der Mittelwert $\overline{\Delta E}$ zu bilden.

b. $\overline{\Delta E} \cdot 1\,110 = x$ U γ-GT/l Serum

γ-GLUTAMYL-TRANSPEPTIDASE (γ-GT)	Kinetischer Test	Serum	E 14.1

Anmerkungen:

1	Max. Lagerzeit der Serumproben bis zur γ-GT-Bestimmung: Zimmertemp.: 5 Tage; 2 - 5 °C: 1 Monat; $<$ -12 °C: 2 Monate (mind.)
2	Bei Verwendung des LACHEMA-Testbestecks wird die Substrat-Puffer-Lg. wie folgt angesetzt: 1 Tablette γ-Glutamyl-p-nitranilid in ca. 15 ml Tris-Puffer bei 50 - 60 °C lösen (Tablette dabei zerstoßen), 2,22 ml Glycylglycin-Lg. zugeben und mit weiterem Tris-Puffer auf 22,2 ml auffüllen.
3	Sind Δ E und $\overline{\Delta E}$ größer als ca. 0,1, dann ist die Serummenge auf 0,050 bzw. 0,020 ml zu reduzieren (In diesen Fällen ist bei der Berechnung $\overline{\Delta E}$ mit den Faktoren F = 2 119 bzw. F = 5 146 zu multiplizieren) oder die Proben sind mit physiol. Kochsalzlg. (1 Teil Serum + 9 Teile phys. Kochsalzlg.) zu verdünnen (Berechnungsergebnis mit dem Faktor 10 multiplizieren!).
4	Bei größeren Serien empfiehlt sich die Verwendung des Meßansatzes EK 5-aut, der das Vermessen von 4 Proben nebeneinander gestattet. In jedem Fall muß der Meßansatz mit einem Umwälzthermostaten genau temperiert werden.
5	Der Faktor F = 1 110 (bzw. 2 119 bzw. 5 146) errechnet sich aus der Beziehung: $$F = \frac{V \cdot 1\,000}{E_K \cdot S}$$ V = Volumen des Probenansatzes in ml. E_K = Molarer Ext.-Koeff. des p-Nitranilins bei 405 nm 9,91 cm²/ Mol. S = eingesetzte Serummenge in ml.

γ-GLUTAMYL-TRANSPEPTIDASE (γ-GT)	Kinetischer Test	Serum	E 14.1

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow; 1978 SVP Berlin; 1977 BIV Rostock; 1978
Präzision:	
in der Serie: (n = 10)	s % ≤ 4,6
von Tag zu Tag: (n = 17)	s % ≤ 10,8 (bei x = 19 U/l)
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 70 (Einzelbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

KREATINKINASE (CPK) (EC 2.7.3.2)	E 15.1

FERMOGNOST®-CPK-Test:

Die CPK katalysiert die Bildung von Kreatinphosphat aus Kreatin und ATP. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird das gebildete Kreatinphosphat im sauren Milieu hydrolysiert und das entstandene Phosphat nach Umsetzung zu Molybdatophosphat und dessen Reduktion zu Molybdänblau photometrisch bestimmt.

Serum, Plasma (Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Herstellung
1	ATP-Lg.	Inhalt der Flasche 514 B in 50 ml dest. Wasser lösen. Aufbewahrung in Glasflasche! Haltbarkeit: max. 3 Wochen bei 2 - 5 °C.
2	Kreatin-ATP-Lg.	Inhalt der Flasche 514 A in 25 ml ATP-Lg. lösen. Aufbewahrung in Glasflasche! Haltbarkeit: max. 3 Wochen bei 2 - 5 °C. (Evtl. krist. Niederschlag vor Gebrauch durch Erwärmen auf max. 40 °C in Lösung bringen.)
3	Thioglykolsäure-Lg.	0,1 ml Thioglykolsäure (80 %) mit dest. Wasser zu 10 ml auffüllen. Haltbarkeit: max. 3 Wochen bei 2 - 5 °C.
4	Trichloressigsäure-Lg. (TCE-Lg.)	40 g Trichloressigsäure p.a. in dest. Wasser zu 250 ml Lg. lösen.
5	Natriumselenit-Lg.	Inhalt der Flasche 514 C in 25 ml TCE-Lg. lösen. Haltbarkeit: max. 3 Wochen
6	Molybdat-Lg.	Inhalt der Flasche 514 D in 200 ml TCE-Lg. lösen.
7	Aminonaphthol-sulfonsäure-Sulfit-Lg.	Inhalt der Flasche 514 E mit 15 ml dest. Wasser versetzen. Mischung am nächsten Tag filtrieren. Filtrat weiterverwenden. Haltbarkeit: 2 Wochen bei 2 - 5 °C.

Fortsetzung Blatt 2

Reagenzien: (Fortsetzung)

8	Molybdat-Reduktionslg.	200 ml Molybdat-Lg. und 8 ml Aminonaphtholsulfonsäure-Sulfit-Lg. mischen Haltbarbeit: 1 Woche bei 2 - 5 °C (!!) (lichtgeschützt).
9	Phosphat-Standard-Lg.	1,6 ml des Inhalts der Flasche 514 F mit dest. Wasser zu 10 ml auffüllen.
10	Inaktiviertes Serum	(Schweine-, Rinder-)Serum 2 Stunden auf 56 °C erwärmen. Oder: SERULAT PK I zur Präzisionskontrolle verwenden.

Konzentrationen im Testansatz:

Kreatin:	76 mM	Mg^{2+}:	6,5 mM
ATP:	4,3 mM	Thioglykolsäure:	9,9 mM
Tris-Puffer:	109 mM		

KREATINKINASE (CPK)	FERMOGNOST ®-CPK-Test	Serum, Plasma	E 15.1

Ausführung: Probenansätze

	Geräte	Ausführung	Anmerkungen
		P / L	
1	PA	0,040 ml Plasma (Serum) / 0,040 ml Plasma (Serum)	5
		in Eiswasser stellen (5 Min.).	2, 4
		+ 0,360 ml Kreatin-ATP-Lg. (eisgekühlt) / + 0,360 ml ATP-Lg. (eisgekühlt)	6
2		+ 0,040 ml Thioglykolsäure-Lg.	
		mischen; genau 30 Min. bei 37 °C inkubieren; danach sofort in Eiswasser stellen.	2, 3 6
3		+ 0,200 ml Natriumselenit-Lg.	
		mischen; zentrifugieren.	
4	H-RG	1,000 ml Molybdat-Reduktionslg. + 0,400 ml Überstand	
		mischen.	
5		P und L nach 30 Min., aber innerhalb von 60 Min., bei 720 nm gegen Wasser photometrieren.	6
		Fortsetzung Blatt 4	



Ausführung (Fortsetzung): Standardansatz

	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
		St	L	
1	PA	0,040 ml Phosphat-Stand.-Lg.	0,040 ml dest. Wasser	
2		+ 0,400 ml dest. Wasser + 0,200 ml Natriumselenit-Lg. mischen.		
3	H-RG	1,000 ml Molybdat-Reduktionslg. + 0,400 ml Mischung aus 2 mischen.		
4		St und L nach 30 Min., aber innerhalb von 60 Min., bei 720 nm gegen Wasser photometrieren.		

Berechnung:

$$\frac{E_P - E_L}{E_{St} - E_L} \cdot 53{,}3 = x \text{ U CPK/1 000 ml Plasma (Serum)}$$

(Anmerkung 6)

Anmerkungen:

1	Als Antikoagulanz bei der Plasmagewinnung nur Heparin verwenden. Max. Lagerungszeit der Proben bis zur CPK-Bestimmung: 2 - 5 °C: 4 Tage ; $<$-12 °C: mind. 1 Monat
2	Das Abkühlen der Probeansätze bewirkt eine Verminderung der Geschwindigkeit der Enzymreaktion. Es wird dadurch möglich, eine größere Probenanzahl unter Routinebedingungen gleichzeitig und unter gleichen Reaktionsbedingungen zu bearbeiten u. reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die bei dieser Arbeitsweise erhaltenen CPK-Aktivitäten liegen um weniger als 2 % niedriger als nach dem Original-FERMOGNOST®-Test, wenn die angegebenen Geräte verwendet werden.
3	Für die Inkubation der Probeansätze bei 37 °C ist ein großvolumiges Wasserbad (Thermostat U 10, Inaktivierungswasserbad) zu verwenden.
4	Für jede Untersuchungsserie ist zusammen mit den Proben ein Kontrollwert anzusetzen. Dazu wird inaktives Serum bzw. SERULAT PK I entsprechend der Ausführungsvorschrift behandelt. Die absolute Extinktionsdifferenz $\|E_P - E_L\|$ darf 0,005 nicht übersteigen. Bei größeren Abweichungen - im allgemeinen ist dann $E_L > E_P$ - ist die Serie mit frisch angesetzten ATP- und Kreatin-ATP-Lösungen zu wiederholen.
5	Achtung! Die Präzision der Methode wird entscheidend beeinflußt von der Genauigkeit der Plasma-(Serum-)Dosierung. Kleine Differenzen zwischen der P- und L-Dosierung verursachen große Fehler, hervorgerufen von der höheren Primärkonzentration an anorg. Phosphat im Plasma (Serum).
6	Der Substrat-Umsatz ist bis ca. 160 U CPK/l Plasma (Serum) proportional der Enzymaktivität. Werden höhere Aktivitäten errechnet - (Der Substrat-Umsatz war dann geringer als der Enzymaktivität entspricht!!), kann die Inkubationszeit auf 20 Min. reduziert werden. Darüber hinaus ist es möglich, das Plasma (Serum) mit inaktivem Serum zu verdünnen oder auch nur 0,020 ml Serum oder Plasma einzusetzen.

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow; 1977 BIV Erfurt; 1976
Präzision: in der Serie: (n = 10)	s % ≤ 6,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % ≤ 7,5 (bei x = 50 U/l)
Probenanzahl/Tag · AK:	mind. 60 (Einzelbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

GESAMT-ÖSTROGENE	H 02.1

KOBER-Reaktion:

Die Östrogene werden ohne vorherige Hydrolyse der Konjugate an SEPHADEX-G 10 adsorbiert und anschließend eluiert.
Mit aliquoten Teilen des Eluats wird die KOBER-Reaktion (Umsetzung der Östrogene in stark schwefelsaurer Lösung mit Phenolen zu orangeroten Reaktionsprodukten) durchgeführt.

Schweineharn, Rinderharn (Schwangerenharn)
(Anmerkung 1)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	SEPHADEX-G 10		
2	Salzsäure	0,3 N	25 ml 37%ige Salzsäure p. a. mit dest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.
3	Ammoniak-Lg.	0,5 N	37,6 ml 25%ige Ammoniak-Lg. p. a. mit dest. Wasser zu 1 000 ml auffüllen.
4	Schwefelsäure p. a.	96%ig	
5	Hydrochinon reinst		aus Wasser umkristallisieren
6	KOBER-Mischung		200 mg Hydrochinon in 15 ml Schwefelsäure lösen.
7	Essigsäure	75%ig	70 ml Eisessig p. a. mit 25 ml dest. Wasser verdünnen.
8	Östrogen-Standard-Lg.		a) 100 mg Östron in 50 ml abs. Äthanol lösen. b) 0,5 ml Lg. a) mit Ammoniak-Lg. auf 100 ml auffüllen (≙ 1 mg Ö./100 ml). c) 2,5, 4,5, 8,0 ml Lg. b) mit Ammoniak-Lg. zu 100 ml auffüllen (≙ 5,0, 9,0, 16,0 mg Ö./1 000 ml Harn).

Ausführung:

A. Säulenchromatographische Abtrennung der Östrogene und ihrer Konjugate aus dem Harn

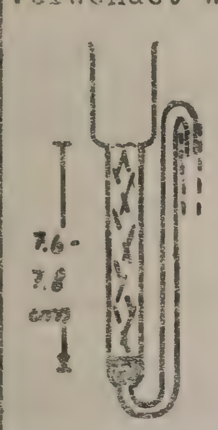
	Geräte	Ausführung		Anmerkungen
1	Chrom.-Säulen			2
2		Aufgabefolge:	Eluat:	
		① 5 ml Salzsäure + 0,5 ml Harn (zentrifugiert)	verwerfen	3,4,5
		② 10 ml Salzsäure	verwerfen	
		③ 5 ml Wasser	verwerfen	
		④ 3 ml Ammoniak-Lg.	verwerfen	
	grad. RG	⑤ 20 ml Ammoniak-Lg.	die ersten 10 ml auffangen	6

Ausführung:

B. Bestimmung der Östrogene im Eluat:

	Geräte	Ausführung				Anmerkungen
1	RG		P	L	St	
			0,40 ml Eluat	0,40 ml Amm.-Lg.	0,40 ml Östrogen-St.-Lg.	
		+	0,75 ml KOBER-Mischung (eisgekühlt)			
			mischen; erhitzen 45 Min. bei 100 - 103 °C (Wasserbad oder Alu-Block), in Eiswasser schnell abkühlen, dunkel stellen.			
2		+	1,40 ml Essigsäure			
			mischen; 5 Min. in Eiswasser stellen; auf Zimmertemperatur anwärmen.			7
3			Fluoreszenzintensität von P und St gegen L innerhalb 30 Min. messen (Primärstrahlung: 510 nm; Sekundärfilter: OG 4).			

Anmerkungen:

1	Die Harne dürfen nicht durch Kot, Stroh, Futter ... verunreinigt oder mit diesen Stoffen in Berührung gekommen sein.
2	Vorschrift zur Formierung der Chromatographie-Säulen: SEPHADEX-G 10 ca. 1 Woche vor Gebrauch in dest. Wasser einquellen. Täglich das Harz aufrühren und nach dem Absetzen der groben Anteile das Feinstkorn mit dem Wasser abdekantieren. Frisches Wasser auffüllen. Verwendet werden Austauschersäulen (Innendurchmesser 9 mm; Länge 8 - 10 cm) mit angeschmolzenem Aufgabebecher (Volumen ca. 25 ml) und S-förmig gebogenem Kapillar-Auslauf, der ein Leerlaufen der Säule verhindert. In das untere Ende der Säule wird ein kleiner Glaswollebausch unter Wasser luftfrei eingebracht. Die Säulen werden mit SEPHADEX-G 10 (in Wasser suspendiert) in einem Guß gefüllt. Die Schichthöhe soll bei allen Säulen einheitlich 7,6 - 7,8 cm betragen. Vor dem ersten Gebrauch werden die Säulen mit 0,3 N Salzsäure, Wasser, 0,5 N Ammoniak-Lg. und Wasser (bis zur neutralen Reaktion) gewaschen. 
3	Durchflußgeschwindigkeiten der aufgegebenen Lösungen durch die Säulen: (1) : max. 5 ml/h (2) - (5) : max. 8 ml/h Die Geschwindigkeit wird eingestellt durch Aufstecken von unterschiedlich langen Plasteschläuchen auf den Säulenauslauf (s. Abb.). Vor Aufgabe jeder neuen Lg. vollständigen Durchlauf (bis zum oberen Austauscherharz-Abschluß!) der vorherigen Lg. abwarten!
4	Werden sehr niedrige Östrogen-Konzentrationen im Harn erwartet (< 1 mg/1 000 ml Harn), dann ist zweckmäßig 1,0 ml Harn gemischt mit 5 ml 0,35 N Salzsäure als (1) auf die Säule aufzugeben. Rechnet man mit hohen Östrogen-Konzentrationen (> 20 mg/1 000 ml Harn), dann gibt man vorteilhaft nur 0,25 ml Harn gemischt mit 5 ml 0,3 N Salzsäure als (1) auf die Säule auf.
5	Die Vorschrift kann auch zur Östrogen-Bestimmung im Rinder- und Schwangerenharn mit folgenden Veränderungen angewendet werden: Rinderharn: Vom Eluat von (5) werden die ersten 14 ml aufgefangen. Schwangerenharn: Es werden die Eluate von (4) und (5), insgesamt die ersten 18 ml, aufgefangen. Die Östrogen-Standard-Lg. ist mit Östriol zu bereiten!

Anmerkungen (Fortsetzung):

6	Zur Regenerierung der Chromatographie-Säulen werden nach (5) nochmals 20 ml Ammoniak-Lg. und anschließend Wasser (bis zur neutralen Reaktion des Eluats) aufgegeben. Die Durchflußgeschwindigkeiten können dabei beliebig groß sein.
7	Die Proben sind generell nach dem Erhitzen bis zur unmittelbaren Messung dunkel zu stellen.

Berechnung:

(Östrogen-Konzentration im Schweineharn)

$$\frac{F_P}{F_{St}} \cdot 5 \text{ (bzw. 9, bzw. 16)} = x \text{ mg GESAMT-ÖSTROGENE/1 000 ml Harn}$$

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1974
Wiederauffindung:	95 - 105 %
Präzision:	
in der Serie: (n = 20)	s % < 4,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % < 6,0
Probenanzahl/Tag • AK:	abhängig von der Anzahl der eingesetzten Chromatographie-Säulen (1 Bestimmung/Säule • Tag)

Verbindlichkeitstermin:	1. 03. 1979

GLUKOSE	K 01.1.1

o-Toluidin-Methode ohne Enteiweißung:

Glukose reagiert mit o-Toluidin in essigsaurer Lösung beim Erhitzen unter Bildung eines blaugrünen Kondensationsprodukts.

(Die Methode ist geeignet für alle hämolysefreien und auch für lipämische Proben.)

Plasma (Serum)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	DEXTROGENS DAB 7		
2	Glukose-Standard-Lg.	100 mg/ 100 ml	Glukose p. a. bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C trocknen. 1 000 mg davon in bei 2-5 °C gesättigter Benzoesäure-Lg. zu 1 000 ml Lg. lösen.
3	DEXTROGENS (modifiziert)		50 ml DEXTROGENS DAB 7 in einem Kolben mit einer Spatelspitze Arsen(III)-oxid p. a. (ca. 15 mg) versetzen und kurz aufkochen lassen (Heizplatte); schnell abkühlen; weitere 50 ml DEXTROGENS DAB 7 zufügen; Reagenz über Glaswolle in eine Braunglasflasche filtrieren. Kühl aufbewahren (s. Anmerkung 4).

GLUKOSE	o-Toluidin-Methode ohne Enteiweißung	Plasma (Serum)	K 01.1.1

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
		P	L	St	
1	H-RG	0,020 ml Plasma	0,020 ml Wasser	0,020 ml Glukose-St.-Lg.	1
2		+ 1,500 ml	DEXTROGENS DAB 7		2, 3
			mischen. 9 Min. im Wasserbad (100 °C) oder im Aluminiumblock erhitzen. Danach schnell in kaltem Wasser abkühlen.		4, 5
3			Innerhalb von 30 Min. P und St gegen L bei 630 nm photometrieren.		

Berechnung:

$$\frac{E_P}{E_{St}} \cdot 100 = x \text{ mg Glukose/100 ml Plasma}$$

GLUKOSE	o-Toluidin-Methode ohne Enteiweißung	Plasma (Serum)	K 01.1.1

Anmerkungen:

1	Bei der Plasma(Serum-)gewinnung genau Arbeitsanweisung A 02.1 bzw. A 03.1 beachten. Die Glukosebestimmung sollte im allgemeinen umgehend durchgeführt werden. Eingefrorene Proben, die nach dem Auftauen Ausflockungen enthalten, sind vor dem Einsatz zu zentrifugieren.
2	Haltbarkeitsangaben für DEXTROGENS DAB 7 beachten! Das Reagenz soll farblos sein; seine Extinktion gemessen gegen Wasser bei 630 nm darf 0,02 nicht übersteigen.
3	Bei Verwendung der Meßansätze EKA oder EK 5 mit Halbmikroküvetten kann die Einsatzmenge an DEXTROGENS DAB 7 auf 1,200 ml reduziert werden.
4	Werden Glukosekonzentrationen unter 40 mg/100 ml erwartet, so ist vorteilhaft DEXTROGENS (modifiziert) einzusetzen. Die Empfindlichkeit der Reaktion steigt dadurch auf das 2- bis 3fache.
5	Werden die Proben in einem kochenden Wasserbad erhitzt, so müssen die Reagenzglasöffnungen mit einem Filterpapier abgedeckt werden. (Durch Wasser (Kondenswasser) wird die Empfindlichkeit der Reaktion herabgesetzt.)

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1976
Wiederauffindung:	98 - 100 %
Präzision:	
in der Serie: (n = 20)	s % $\leq$ 2,0
von Tag zu Tag: (n = 20)	s % $\leq$ 3,0
Probenanzahl/Tag • AK:	mind. 300 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979

GLUKOSE	K 01.2.S

FERMOGNOST®-Blutzucker-Siebtest:

Glukose wird in Gegenwart von Sauerstoff und Wasser durch Glukoseoxydase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid dehydriert mit Hilfe von Peroxydase o-Dianisidin zu einem in schwefelsaurer Lösung stabilen roten Farbstoff.

Die Farbintensitäten der roten Farbstofflösungen werden visuell gegen die von Testseren eingeschätzt.

Plasma,(Serum)

Reagenzien:

Nr.	Reagenz	Konz.	Herstellung
1	GOD-POD-Dianisidin-Lg.		a) Inhalt der Flasche 501/180 A in dest. Wasser zu 60 ml Lg. lösen. 0,3 ml Chloroform zugeben. Haltbarkeit: mind. 30 Tage bei 2 - 5 °C. b) Inhalt der Flasche 501/180 B in 4 ml dest. Wasser lösen. Lg. kühl aufbewahren. c) 10 ml Lg. a) mit 0,1 ml Lg. b) mischen. Haltbarkeit: 12 Stunden bei 2 - 5 °C.
2	Schwefelsäure	16 N	22,5 ml konz. Schwefelsäure langsam und unter Kühlung zu 25 ml dest. Wasser geben. Abkühlen. Mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen.

GLUKOSE	FERMOGNOST® -Blutzucker-Siebtest	Plasma (Serum)	K 01.2.S

Ausführung:

	Geräte	Ausführung			Anmerkungen
1	Mischplatte		0,200 ml dest. Wasser		1
2			P	St	2
		+	0,010 ml Plasma (Serum)	+ 0,010 ml Testserum	
			mischen.		
3	Tüpfelplatte		0,025 ml Verdünnung		
		+	0,070 ml GOD-POD-Dianisidin-Lg.c		
			mischen. 20 Min. stehen lassen.		
4		+	0,070 ml Schwefelsäure		3
			mischen.		
5			Farbintensitäten der roten Lösungen einschätzen.		

Auswertung:

Die Farbintensitäten der roten Reaktionslösungen sind proportional der Plasma-(Serum-)Glukose-Konzentrationen.

Die Farbintensitäten der Reaktionslösungen werden visuell gegen die des Glukose-Testserums eingeschätzt.

GLUKOSE	FERMOGNOST® -Blut-zucker-Siebtest	Plasma (Serum)	K 01.2.S

Anmerkungen:

1	Die bereiteten Serum-Verdünnungen können auch für den γ-Globulin-Siebtest (E 03.1.S) und den GESAMT-EIWEISS-Siebtest (E 01.2.S) eingesetzt werden.
2	Die Glukose-Konzentration des Testserums ist so zu wählen, daß sie der unteren Normgrenze der betreffenden Tierart entspricht.
3	Es ist bei einiger Übung auch möglich, die Farbintensitäten der gelborangen Reaktionsmischungen vor Zugabe der Schwefelsäure visuell einzuschätzen. In diesem Fall mischt man 0,060 ml Verdünnung mit 0,100 ml GOD-POD-Dianisidin-Lg. und beurteilt die Farbintensitäten nach 20 Min. Die Färbung der Proben verblaßt nach einiger Zeit!

Methodenmerkmale:

Methodenbearbeitung:	IaT Eberswalde-Finow, 1976
Proben mit Glukosekonzentrationsdifferenzen von 10 mg/100 ml sind gut voneinander zu unterscheiden.	
Probenanzahl/Tag • AK:	mind. 500 (Einfachbestimmungen)

Verbindlichkeitstermin: 1. 03. 1979



Institut für angewandte Tierhygiene
Eberswalde

September 1982

3. Lieferung der "Klinisch-chemischen Untersuchungsmethoden für veterinärmedizinische Einrichtungen der DDR", Eberswalde 1982

Anbei übergeben wir Ihnen die 2. Fortsetzung der 1976 mit der 1. Lieferung erschienenen Arbeitsmappe für das klinisch-chemische Labor.
Diese 3. Lieferung umfaßt neue Untersuchungsmethoden und überarbeitete Methoden bzw. Methodenschritte, die bereits in der 1. und 2. Lieferung erschienen sind.

Wir bitten Sie, die einzelnen Methoden sorgfältig in Ihre Arbeitsmappen einzuordnen. Achten Sie insbesondere darauf, daß Sie beim Einheften der überarbeiteten Methoden (komplette Methoden oder auch nur einzelne Blätter!) die entsprechenden alten Seiten aus Ihrer Arbeitsmappe entfernen.

